

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 7242 – BSC / UMR 7357 – ICube

THÈSE présentée par :

Thibaut HUBERT

soutenue le : **18 septembre 2023**

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

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* à l'acquisition
du fer : modélisation mathématique des switchs
phénotypiques**

THÈSE dirigée par :

Dr. Isabelle SCHALK

Directrice de Recherche, Université de Strasbourg

Dr. Morgan MADEC

Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. Pascal ARNOUX

Directeur de Recherche, Aix-Marseille Université

Dr. Nadia IZADI-PRUNEYRE

Directrice de Recherche, Université Paris Cité

EXAMINATEURS :

Pr. Laurence SABATIER

Professeur, Université de Strasbourg

Dr. Pablo MANFREDI

Chargé de recherches, Université de Bâle

INVITÉ :

Dr. Julien GODET

Maître de conférences / Praticien hospitalier, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu l'ensemble des membres du jury de soutenance, Dr. Pascal Arnoux, Dr. Nadia Izadi-Pruneyre, Pr. Laurence Sabatier et Dr. Pablo Manfredi pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci également au Dr. Julien Godet d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'invité. Et je remercie une seconde fois Dr. Pascal Arnoux et Dr. Julien Godet pour avoir constitué le jury de mon Comité de Suivi de Thèse.

Je remercie Isabelle pour m'avoir accueilli dans l'équipe et pour m'avoir fait confiance sur ce projet de thèse un peu particulier avec son sujet transversal. Merci pour toutes les discussions très enrichissantes sur le sujet et merci pour ton soutien tout au long de ces trois années.

Un grand merci à Morgan pour m'avoir fait confiance pour réaliser ce projet sans gros bagage en modélisation. Tu m'as fait découvrir un domaine que je ne connaissais pas et auquel j'ai bien accroché, et je pense que c'est grâce à ta patience, ton optimisme et ta bonne humeur.

Je tiens à remercier Gaëtan de m'avoir accueilli dans l'équipe, merci de ta bienveillance et de ta bonne humeur. Merci à toi Olivier pour tes idées, tes questions et tes critiques toujours très constructives, et merci de m'avoir aidé à mettre au point certaines expériences. Un grand merci à Anne pour toute ton aide et merci à Valérie, Coraline, Pierre, Régine, Véro et Françoise pour votre soutien tant professionnel que personnel.

Merci à toute la team du midi pour ces pauses repas très enrichissantes intellectuellement : Aline, Virginie (les commandes consommables n'avaient qu'à bien se tenir), Manon, Pauline (et un grand merci pour ton aide pour sortir tous mes résultats), Johan, Gwen, Sarah, Seb, Christos, Linna et tous les stagiaires. Merci pour cette belle entraide au travail et pour tous ces moments en dehors.

Je tiens à remercier solennellement les girls du bureau, Pr. Lemare et Doc Puja. Marion, on s'est lancé dans nos thèses comme des miséreux et on s'en est sorti comme des seigneurs, la tête haute et sur les épaules, aucun craquage, que du sérieux. C'était cool d'être en binôme pour traverser toutes ces étapes, ces virages et ces contre-sens. Hélène, merci d'avoir toujours été là dans cette aventure faite de hauts, de bas et de headbangs. Toujours présente au poste d'attaquant de pointe de la bonne réplique et de défenseur central aux tacles glissés incontrôlés. Un grand merci à vous deux mes petites bobos wokistes alphas du bureau de l'enfer.

Merci aux chameaux du SPP et à toute la bande de joyeux lurons campagnards : Robin, Pierre, Val, Bertrand, Charles, Loudav, Sysy, Coco, Lulu, Guigui, Yoyo, Anaïs, Lélé, Julie, Soso, Julo, Julie P, Sarah, Flo et Théo. Ça fait toujours un bien fou de vous voir, vous êtes une belle bande de copains les copains. Que du love.

Merci à mes frérots Lyes, Briec et Patrick, mes Pillar Men. Un soutien sans faille et inconditionnel depuis toujours, le sang de la veine.

Un énorme merci à mes parents Claire et Jean-Luc et à mon big bro Antoine pour tout ce que vous m'avez apporté. Merci à toute la famille, mais également à Marie Claude, Jacky, Maxime, et toute ma belle-famille de m'avoir toujours soutenu et encouragé.

Et pour finir, merci à Émilia sans qui je ne serai peut-être pas arrivé au bout de cette thèse. Merci du fond du cœur pour tout, merci d'illuminer ma vie et de me donner la force de persévérer.

Table des matières

Liste des figures et tableaux	7
Liste des abréviations.....	11
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
Chapitre I : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et le fer	17
1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
1.1 Une bactérie ubiquitaire et opportuniste	19
1.2 Infections et résistance antimicrobienne	20
2 Acquisition du fer par <i>P. aeruginosa</i>	22
2.1 Le fer, élément clé de la biochimie des êtres vivants	22
2.2 Les sidérophores, molécules chélatrices de fer	23
2.2.1 Généralités.....	23
2.2.2 Sélectivité et groupements chélateurs.....	24
2.3 Les transporteurs de sidérophores de la membrane externe.....	25
2.3.1 Les transporteurs TonB-dépendants présents dans le génome de <i>P. aeruginosa</i>	25
2.3.2 Affinité d'un TBDT pour son ligand.....	28
2.3.3 Transport du complexe sidérophore-Fe à travers la membrane externe	28
2.4 Devenir du complexe sidérophore-Fe dans le périplasme.....	31
Chapitre II : Systèmes de régulation de <i>P. aeruginosa</i> pour l'acquisition du fer	33
1 Régulation transcriptionnelle.....	35
1.1 La protéine Fur	35
1.2 Les ECF- σ	39
1.3 Le système à deux composantes	42
1.4 Les régulateurs de type AraC	44
1.5 Les régulateurs de type IclR	45
1.6 Le QS.....	46
1.7 Autres régulateurs transcriptionnels	49
2 Régulation post-transcriptionnelle.....	49

2.1	Les petits ARN interférents	49
2.2	La protéine de liaison à l'ARN Hfq	51
Chapitre III : Voies d'acquisition du fer chez <i>P. aeruginosa</i>		53
1	Voies d'acquisition du fer impliquant des sidérophores endogènes	55
1.1	Voie de la PVD	55
1.1.1	Biosynthèse et sécrétion	55
1.1.2	Import du complexe PVDI-Fe et régulation de la voie.....	57
1.2	Voie de la PCH	60
1.2.1	Biosynthèse et sécrétion	60
1.2.2	Import du complexe PCH-Fe et régulation de la voie.....	61
2	Voies d'acquisition du fer impliquant des sidérophores exogènes.....	63
2.1	Voies des catéchols.....	63
2.1.1	Tri- et bicatéchols	63
2.1.1.1	L'entérobactine.....	63
2.1.1.2	La protochéline, l'azotochéline et la salmochéline S4.....	68
2.1.2	Monocatéchols	69
2.2	Voie des Hydroxamates	71
2.2.1	La nocardamine	71
2.2.2	La desferrioxamine B.....	74
2.2.3	Le ferrichrome	75
2.3	Voie de la vibriobactine	76
2.4	Voie des mycobactines et carboxymycobactines.....	78
2.5	Voie de l'aérobactine, la schizokinen et la rhizobactine	79
3	Autres voies d'acquisition du fer.....	80
3.1	Voie du citrate	80
3.2	Voie de l'hème	81
3.3	Voie du Pseudomonas quinolone signal	83
3.4	Voie du fer ferreux.....	84
4	Voies d'acquisition de métaux autres que le fer	86
5	Les switches phénotypiques concernant l'expression des voies d'import du fer	89
Chapitre IV : Sidéromycines naturelles et synthétiques, stratégie du Cheval de Troie		93
1	Sidéromycines naturelles.....	95
2	Sidéromycines synthétiques	96
2.1	Le céfidérol	96

2.2	Sidéromycines synthétiques en développement	97
Chapitre V : Modélisation mathématique des mécanismes biologiques de <i>P. aeruginosa</i>.....		
	<i>aeruginosa</i>	99
1	La modélisation dans le domaine de la biologie.....	101
2	Modèles de différents mécanismes biologiques de <i>P. aeruginosa</i>	102
	Problématique du projet de thèse.....	103
PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES		
		107
1	Matériel et méthodes biologiques.....	109
1.1	Rapporteur transcriptionnel	109
1.1.1	Fusion transcriptionnelle	109
1.1.1.1	Description de la technique	109
1.1.1.2	Gènes rapporteurs utilisés	109
1.1.2	Construction de mutants	110
1.2	Milieux et conditions de culture	110
1.2.1	Milieux de culture.....	110
1.2.2	Conditions de culture	110
1.2.3	Surnageants de culture	111
1.2.3.1	Souches utilisées.....	111
1.2.3.2	Cultures de Kp et Ga et récupération des surnageants.....	111
1.3	Sidérophores	111
2	Acquisition et traitement des données.....	112
2.1	Analyse de croissance, de production de PVDI et de fluorescence.....	112
2.2	PCR en temps réel.....	112
2.3	Traitement de données	115
3	Modélisation mathématique	116
3.1	Dynamique de fluorescence	116
3.2	Modèle de régulation de type « Hill »	118
3.3	Modèle de régulation de type « Logarithmique »	120
3.4	Méthode de comparaison entre jeux de données	121
3.4.1	Normalisation	121
3.4.2	Comparaison des données et modélisation commune.....	122
PARTIE III : RÉSULTATS.....		
		125

Chapitre I : Approches expérimentales de protéomique et qRT-PCR pour étudier l'expression des voies d'acquisition du fer chez <i>P. aeruginosa</i>	127
Chapitre II : Méthodes expérimentales et informatiques pour étudier les variations comportementales de l'expression des TBDT en réponse à la concentration de sidérophores chez <i>P. aeruginosa</i>	133
Résumé de l'article.....	135
Chapitre III : Expression de PfeA, FoxA, FpvA et FptA en présence d'un exosidérophore seul, d'un mélange d'exosidérophores et d'un surnageant de culture de bactéries productrices de sidérophores	179
1 Expression de PfeA et FoxA en présence d'un mélange d'ENT et NOCA	181
2 Expression de PfeA et FoxA en présence de PROTO et DFOB.....	184
2.1 Expression de PfeA en présence d'un gradient de concentrations de PROTO	185
2.2 Expression de FoxA en présence d'un gradient de concentration de DFOB	186
3 Expression de FpvA et FptA en présence d'ENT ou de NOCA.....	188
3.1 Construction des souches rapportrices <i>promfpvA</i> -YPet et <i>promfptA</i> -YPet	188
3.2 Analyse de l'expression génétique de <i>fpvA</i> en présence d'un gradient de concentrations d'ENT ou de NOCA avec la souche <i>promfpvA</i> -YPet.....	192
3.2.1 Suivi de croissance, de production de PVDI et de fluorescence de YPet	192
3.3 Analyse de l'expression génétique de <i>fptA</i> en présence d'un gradient d'ENT ou de NOCA avec à la souche <i>promfptA</i> -YPet	196
3.3.1 Suivi de croissance et de fluorescence de YPet	196
4 Expression de PfeA, FoxA et FptA en présence de surnageant de cultures de bactéries produisant des sidérophores.....	201
PARTIE IV : DISCUSSION & CONCLUSION	209
1 Construction génétique de gène rapporteur par fusion de promoteur.....	211
2 Expression génétique de <i>pfeA</i> et <i>foxA</i> en présence de concentrations croissantes d'un exosidérophore.....	212
3 Expression génétique de <i>fpvA</i> et <i>fptA</i> en présence de concentrations croissantes d'ENT ou de NOCA	214
4 Quantifications de sidérophore dans des surnageants de culture	216

5	Modèles d'apprentissage pour la modélisation de l'expression de TBDT en présence de mélange de sidérophores.....	217
5.1	Problématique	217
5.2	Régression par plus proches voisins (KNN)	218
5.3	Arbres de décision	219
5.4	Réseaux de neurones (NN)	220
5.5	Problématique du surapprentissage	221
5.6	Modélisation des données de mélanges avec l'approche de machine learning	222
6	Conclusion	225
	Bibliographie.....	227
	Annexes.....	251

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : <i>P. aeruginosa</i> vue par microscopie électronique à balayage (Tsang et al., 2003).....	18
Figure 2 : Exemples de sidérophores et de leurs fonctions chélatrices	23
Tableau 1 : Constantes d'affinité (K_a) de différents sidérophores pour le fer ferrique	24
Figure 3 : Structure cristallographique de PirA (Moynié et al., 2017).....	25
Tableau 2 : Transporteurs TonB-dépendant de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	26
Tableau 3 : Constantes de dissociation (K_d) de différents transporteurs TonB-dépendant avec différents ligands complexés au fer.....	27
Figure 4 : Structure du complexe ExbB-ExbD dans des nanodisques lipidiques (Celia et al., 2019)	28
Figure 5 : Processus de transport TonB-dépendant	29
Figure 6 : Mécanisme de la régulation médiée par Fur	35
Figure 7 : Implication de Fur dans l'homéostasie du fer chez <i>P. aeruginosa</i>	37
Figure 8 : Mécanisme de transduction du signal des ECF- σ avec protéolyse intramembranaire régulée	39
Figure 9 : Vue schématique de la liaison de l'holoenzyme RNAP aux régions promotrices (Mejía- Almonte et al., 2020).....	40
Tableau 4 : Facteurs σ et anti- σ de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 associés à leur TBDT	41
Figure 10 : Mécanisme d'un système de signalisation à deux composantes	42
Figure 11 : Mécanisme de régulation de la transcription par les régulateurs de type AraC	44
Figure 12 : Structures des molécules signal (auto-inducteurs) du QS	46
Figure 13 : Les quatre voies du QS (Las, Rhl, Pqs et Oxylipines)	47
Figure 14 : Structure de la PVDI.....	54
Figure 15 : Voies de biosynthèse de la PVDI chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (Schalk et al., 2020)	56
Figure 16 : Structure aux rayons X de FpvA, le TBDT du complexe PVDI-Fe (Brillet et al., 2007).....	57
Figure 17 : Voie d'acquisition du complexe PVDI-Fe	58
Figure 18 : Organisation des gènes des voies de biosynthèse et d'acquisition de la PVDI chez PAO1 .	59
Figure 19 : Structure de la PCH.....	59
Figure 20 : Structure aux rayons X de FptA lié au complexe PCH-Fe (Brillet et al., 2011).....	60
Figure 21 : Voie d'acquisition du complexe PCH-Fe	61
Figure 22 : Organisation des gènes des voies de biosynthèse et d'acquisition du fer par la PCH chez PAO1	61
Figure 23 : Structure de l'ENT.....	63

Figure 24 : Structure aux rayons X de PfeA (Moynié et al., 2019)	64
Figure 25 : Région promotrice de <i>pfeA</i>	65
Figure 26 : Voie d'acquisition du complexe ENT-Fe.....	66
Figure 27 : Organisation des gènes des voies d'acquisition des exosidérophores chez PAO1	67
Figure 28 : Structures de sidérophores tri- et bicatécholés.....	68
Figure 29 : Structures de monocatéchols chélateurs de fer et pouvant être utilisés comme des sidérophores par <i>P. aeruginosa</i>	69
Figure 30 : Voie d'acquisition des complexes monocatéchols-fer	70
Figure 31 : Structure de la NOCA.....	71
Figure 32 : Structure aux rayons X du complexe FoxA-NOCA-Fe (Normant et al., 2020).....	72
Figure 33 : Région promotrice de <i>foxA</i>	73
Figure 34 : Structure de la DFOB	74
Figure 35 : Structure du FERRI et de ses dérivés	74
Figure 36 : Voie d'acquisition des sidérophores de type hydroxamate complexés au fer.....	75
Figure 37 : Structure de la VIB	76
Figure 38 : Voie d'acquisition du complexe VIB-Fe.....	77
Figure 39 : Structure générale des MYCO et CMYCO	77
Figure 40 : Voie d'acquisition des complexes MYCO-Fe et CMYCO-Fe	78
Figure 41 : Structures de sidérophores mixtes de type α -hydroxycarboxylate/hydroxamates	79
Figure 42 : Structure du citrate	79
Figure 43 : Voie d'acquisition du complexe citrate-Fe.....	80
Figure 44 : Structure de l'hème B.....	81
Figure 45 : Voie d'acquisition de l'hème	82
Figure 46 : Structure du PQS	82
Figure 47 : Voie d'acquisition du fer par le système PQS	83
Figure 48 : Structures de phénazines produites par <i>P. aeruginosa</i>	84
Figure 49 : Voie d'acquisition du fer ferreux	84
Figure 50 : Structure chimique de la pseudopaline	85
Figure 51 : Voie d'acquisition de la pseudopaline complexée au zinc ou au nickel	87
Figure 52 : Mécanisme d'adaptation phénotypique de l'expression des voies d'acquisition du fer chez <i>P. aeruginosa</i> en présence d'exosidérophores.....	90
Figure 53 : Structures des albomycines et du céfidéocol	95
Figure 54 : Structure des vecteurs TCV, MECAM et DOTAM	97
Figure 55 : Schéma du fonctionnement du modèle	104
Tableau 5 : Souches mutantes construites par fusion transcriptionnelle.....	109

Tableau 6 : Souches utilisées pour les expériences avec surnageants de culture	110
Figure 56 : Équation de production $P(t)$	117
Figure 57 : Exemple d'équations de Hill $H(x)$	119
Figure 58 : Exemple d'équation Lx	120
Figure 59 : Exemple de comparaison de jeux de données normalisés	122
Figure 60 : Clustermap de l'expression des TBDT présents dans le génome de <i>P. aeruginosa</i> par analyses protéomiques	129
Figure 61 : Valeurs β trouvées en cultivant <i>prompfeA</i> -mCherry et <i>promfoxA</i> -mCherry en présence d'un mélange d'ENT et de NOCA.....	181
Figure 62 : Valeurs β de la souche <i>promfoxA</i> -mCherry cultivée avec des mélanges de NOCA (30, 50 ou 70 μ M) et d'ENT (gradient de 0,1 à 100 μ M)	182
Figure 63 : Taux de production de mCherry (β) pour la souche <i>prompfeA</i> -mCherry en fonction de gradients de concentrations de PROTO et ENT	185
Figure 64 : Taux de production de mCherry (β) de la souche <i>promfoxA</i> -mCherry selon des gradients de concentration de différents sidérophores hydroxamates	186
Figure 65 : Analyse de la transcription de <i>pfeA</i> , <i>foxA</i> , <i>fpvA</i> et <i>YPet</i> pour la souche <i>promfpvA</i> -YPet en présence d'ENT ou de NOCA	188
Figure 66 : Analyse de la transcription de <i>pfeA</i> , <i>foxA</i> , <i>fptA</i> et <i>YPet</i> pour la souche <i>promfptA</i> -YPet en présence d'ENT ou de NOCA	190
Figure 67 : Suivi de croissance et de production de PVDI de la souche <i>promfpvA</i> -YPet.....	192
Figure 68 : Fluorescence à 540 nm de la souche <i>promfpvA</i> -YPet au cours de la croissance en présence des sidérophores ENT ou NOCA	194
Figure 69 : Fluorescence à 540 nm de la souche <i>promfptA</i> -YPet au cours de la croissance en présence des sidérophores ENT ou NOCA	196
Figure 70 : Variation de la production de YPet pour la souche <i>promfptA</i> -YPet cultivée en milieu CAA en absence et en présence de concentrations croissantes d'ENT et de NOCA.....	198
Figure 71 : Normalisation de l'expression de <i>fptA</i>	199
Figure 72 : Suivi de croissance et de fluorescence des souches <i>prompfeA</i> -mCherry, <i>promfoxA</i> -mCherry et <i>promfptA</i> -YPet en présence de surnageants de culture de <i>Kp</i> WT, <i>Kp</i> Δ entC ou <i>Ga</i> ...201	
Figure 73 : Production de mCherry par la souche <i>prompfeA</i> -mCherry et de YPet par la souche <i>promfptA</i> -YPet dans des cultures avec du surnageant de <i>Kp</i>	203
Figure 74 : Production de mCherry par la souche <i>promfoxA</i> -mCherry et de YPet par la souche <i>promfptA</i> -YPet dans des cultures avec du surnageant de <i>Ga</i>	205
Figure 75 : Exemple de la méthode KNN avec $k = 5$	218
Figure 76 : Exemple de la méthode RN	219

Figure 77 : Exemple de la méthode NN	220
Figure 78 : Comparaison des modèles de production de mCherry par <i>promfoxA</i> -mCherry en présence de mélanges d'ENT et NOCA	222
Tableau 7 : Souches et plasmides utilisés dans ce travail	250
Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés dans ce travail	251

Liste des abréviations

ABC	<i>ATP Binding Cassette</i> , cassette liant l'ATP
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
AZOTO	Azotochéline
AZOTO-Fe	Azotochéline complexée à l'ion ferrique
CAA	<i>Casamino Acid</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , ADN complémentaire
CMYCO	Carboxymycobactine
CMYCO-Fe	Carboxymycobactine complexée à l'ion ferrique
Cq	<i>Cycle of quantification</i> , cycle de quantification
CSS	<i>Cell Surface Signaling</i> , signalisation de la surface cellulaire
DFOB	Desferrioxamine B
DFOB-Fe	Desferrioxamine B complexée à l'ion ferrique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO_{400 nm}	Densité Optique à 400 nm
DO_{600 nm}	Densité Optique à 600 nm
DOTAM	1,4,7,10-tetrakis(carbamoylméthyl)1,4,7,10-tetraazacyclododécane
E	Efficacité d'amplification
ECF-σ	Facteur σ à fonction extracytoplasmique
ENT	Entérobactine
ENT-Fe	Entérobactine complexée à l'ion ferrique
FERRI	Ferrichrome
FERRI-Fe	Ferrichrome complexé à l'ion ferrique
Fur	<i>Ferric Uptake Regulator</i>
Ga	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>
GOI	<i>Gene Of Interest</i> , gène d'intérêt
Has	<i>Heme-acquisition system</i> , système d'acquisition d'hème
IMC	Interpolation Multidimensionnelle Cubique
IML	Interpolation Multidimensionnelle Linéaire
K_a	Constante d'affinité pour le fer ferrique
K_d	Constante de dissociation d'un TBDT avec un ligand
KNN	<i>K Nearest Neighbors</i> , k plus proches voisins

Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i> Lennox
LC	<i>Liquid Chromatography</i> , chromatographie liquide
LDS	<i>Learning Data Set</i> , base de données d'entraînement
MECAM	1,3,5-N,N',N''-tris-(2,3dihydroxybenzoyl)-triaminométhylbenzène
mRNA	<i>messenger RNA</i> , ARN messenger
MSE	<i>Mean Square Error</i> , erreur quadratique moyenne
MS/MS	<i>tandem Mass Spectrometry</i> , spectrométrie de masse en tandem
MYCO	Mycobactine
MYCO-Fe	Mycobactine complexée à l'ion ferrique
NF	<i>Normalisation Factor</i> , facteur de normalisation
NN	<i>Neural Network</i> , réseau de neurones
NOCA	Nocardamine (Desferrioxamine E)
NOCA-Fe	Nocardamine complexée à l'ion ferrique
NRPS	<i>Non Ribosomal Peptide Synthetase</i> , synthétase non ribosomale de peptides
ODS	<i>Oxylipin-Dependent quorum-sensing System</i>
PCH	Pyochéline
PCH-Fe	Pyochéline complexée à l'ion ferrique
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Phu	<i>Pseudomonas heme uptake</i>
PQS	<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i>
PROTO	Protochéline
PROTO-Fe	Protochéline complexée à l'ion ferrique
PVD	Pyoverdine
PVDI	Pyoverdine de type I
PVDI-Fe	Pyoverdine de type I complexée à l'ion ferrique
qRT-PCR	PCR quantitative en temps réel
QS	<i>Quorum Sensing</i>
REF1	<i>Reference gene 1</i> , gène de référence 1
REF2	<i>Reference gene 2</i> , gène de référence 2
RF	<i>Random Forest</i> , forêt d'arbres décisionnels aléatoires
RIP	<i>Regulated intramembrane proteolysis</i> , protéolyse intramembranaire régulée
RMSE	<i>Root Mean Square Error</i> , écart quadratique moyen
RNAP	<i>RNA Polymerase</i> , ARN polymérase
RQ	<i>Relative Quantification</i> , quantification relative

RT	<i>Reverse Transcriptase</i> , transcriptase inverse
SALMO	Salmochéline S4
SD	<i>Standard Deviation</i> , écart-type
SE	<i>Standard Error</i> , erreur standard
SHAP	<i>SHapley Additive exPlanations</i> , explications additives de Shapley
SL	<i>Supervised Learning</i> , apprentissage supervisé
sRNA	<i>small regulatory RNA</i> , petit ARN régulateur
TBDT	<i>TonB-Dependent Transporter</i> , transporteur TonB-dépendant
TCV	<i>Tris-Catechol Vector</i>
VIB	Vibriobactine
VIB-Fe	Vibriobactine complexée à l'ion ferrique
WT	<i>Wild-Type</i>
XAI	<i>Explainable AI</i> , intelligence artificielle explicative
Zur	<i>Zinc Uptake Regulator</i>

PARTIE I :

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :

Pseudomonas aeruginosa et le fer

1 *Pseudomonas aeruginosa*

1.1 Une bactérie ubiquitaire et opportuniste

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie présente partout dans l'environnement, elle peut être trouvée dans différents habitats tels que le sol, l'eau, l'air ou les aliments. De plus, elle est capable de se développer dans une grande variété de conditions. Elle a été découverte pour la première fois en 1882 par Carle Gessard, microbiologiste français (Gessard, 1984). Cette bactérie est de type Gram négatif, ce qui se caractérise par une enveloppe cellulaire composée d'une membrane cytoplasmique interne, d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe contenant des lipopolysaccharides. Les caractéristiques morphologiques et structurales de *P. aeruginosa* incluent une taille de 1 à 5 μm de long et une mobilité dite monotriche, résultant de la présence d'un unique flagelle polaire (Figure 1).

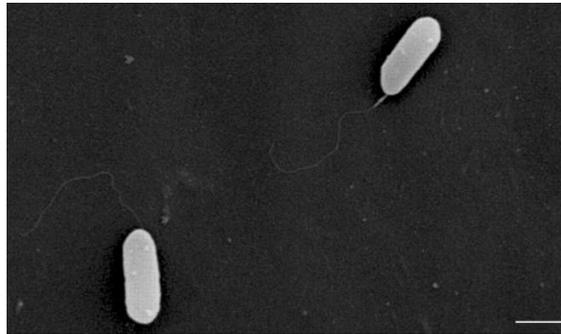


Figure 1 : *P. aeruginosa* vue par microscopie électronique à balayage (Tsang *et al.*, 2003). Barre d'échelle = 1 μm .

P. aeruginosa possède l'un des plus grands génomes bactériens avec 6,3 millions de paires de bases et environ 5 570 cadres ouverts de lecture ont été identifiés (Stover *et al.*, 2000b). Parmi ces gènes, plus de 520 codent pour des protéines régulatrices, environ 150 pour des protéines de la membrane externe et environ 300 pour des protéines de la membrane interne. La taille du génome et le grand nombre de gènes codant pour des protéines régulatrices sont des caractéristiques remarquables permettant à *P. aeruginosa* de coloniser et de s'adapter à des environnements changeants, diversifiés, voire extrêmes.

La faculté d'adaptation de *P. aeruginosa* découle de sa capacité à détecter et à réagir aux changements environnementaux. Cette bactérie peut percevoir et adapter son métabolisme à des variations de pH, de température, de pression osmotique, ainsi qu'à la fluctuation de disponibilité de ses nutriments. En ce qui concerne son métabolisme respiratoire, elle privilégie la respiration aérobie, cependant elle est également capable de s'adapter à des environnements présentant des conditions de microaérobie ou

d'anaérobie (Alvarez-Ortega and Harwood, 2007). *P. aeruginosa* tolère des températures allant de 4°C à 42°C, mais sa température de croissance optimale se situe à 37°C (Barbier *et al.*, 2014). Elle peut se développer dans des conditions de pH allant de 5,4 à 8,5 (Tsuji *et al.*, 1982).

P. aeruginosa alterne entre deux modes de croissance en fonction de son environnement, une forme mobile et une forme sessile. Sa forme mobile, appelée forme planctonique, lui permet d'explorer de nouvelles niches écologiques grâce à son flagelle polaire. Sous cette forme, la bactérie peut se déplacer vers l'environnement le plus propice à son développement. Cette capacité de mouvement accélère sa prolifération. La forme planctonique présente un métabolisme très actif, favorisant ainsi une croissance rapide et une forte capacité d'adaptation. Ce mode de croissance offre à *P. aeruginosa* une grande flexibilité pour prospérer dans des conditions variables et coloniser de nouveaux milieux.

La forme sessile de *P. aeruginosa* se caractérise par la formation d'un biofilm. Les bactéries s'attachent à une surface, se regroupent et s'organisent dans une matrice extracellulaire composée principalement de polysaccharides (O'Toole *et al.*, 2000). La vie en biofilm présente de nombreux avantages pour la bactérie : elle confère une meilleure résistance aux contraintes physiques grâce à la matrice extracellulaire dense et elle offre également une meilleure protection contre les autres micro-organismes, contre le système immunitaire de l'hôte lors d'une infection et contre les antibiotiques (Thi *et al.*, 2020). Le biofilm offre à *P. aeruginosa* un mode de vie adaptatif et résistant, lui permettant de prospérer dans divers environnements et de maximiser ses chances de survie.

1.2 Infections et résistance antimicrobienne

P. aeruginosa peut infecter un large spectre d'organismes : plantes, nématodes, insectes et divers mammifères dont l'être humain. Responsable jusqu'à 15 % des infections acquises à l'hôpital, elle est classée parmi les principaux agents infectieux nosocomiaux. Cette prévalence s'explique par sa présence dans les milieux hydriques aérosols et sur les outils d'interventions invasives (sondes urinaires, cathéters veineux, intubation et ventilation assistée par exemple). Les infections à *P. aeruginosa* peuvent se produire à de multiples niveaux : oculaire (kératite), auriculaire (otite), cutané (folliculite), urinaire, gastro-intestinal, respiratoire (pneumonie) et sanguin (bactériémie). Elles peuvent être superficielles, aiguës mais non invasives chez les patients immunocompétents, aiguës et invasives chez les patients présentant des comorbidités ou immunodéprimés, ou alors chroniques. Lors de situations d'infections aiguës, la présence de *P. aeruginosa* se manifeste essentiellement sous une forme planctonique, tandis que dans le contexte d'infections chroniques, elle prédomine sous forme de biofilms. Selon le type d'infection et selon l'état de santé des patients, les taux de mortalité peuvent varier considérablement, allant par exemple de 18 à 61 % (Yulin Zhang *et al.*, 2020). Dans le cas des

pneumonies, principales manifestations cliniques de *P. aeruginosa* chez le patient atteint de mucoviscidose, les données du registre français de surveillance de 2017 rapportent sa présence dans au moins un prélèvement respiratoire chez 37 % des patients, dont 21 % sont chroniquement colonisés par cette bactérie.

D'après le rapport de Jim O'Neill de 2016, à moins que des solutions pour ralentir la résistance aux antibiotiques ne soient trouvées dès maintenant, il est prévu que d'ici 2050, dix millions de vies par an et 100 billions de dollars cumulés de production économique soient en danger en raison de l'augmentation des infections de bactéries résistantes aux antibiotiques. Chaque année, 700 000 personnes décèdent des suites de ces infections causées par des bactéries résistantes. Dans le but de lutter contre cette résistance croissante aux médicaments antimicrobiens, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a publié sa première liste de « pathogènes prioritaires » résistants aux antibiotiques. Cette liste contient 12 groupes de bactéries qui représentent la menace la plus importante pour la santé humaine. Son objectif est de fournir des orientations et des encouragements pour le développement de nouveaux antibiotiques grâce à des initiatives de recherche et développement. L'acronyme ESKAPE regroupe les souches les plus virulentes et résistantes : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter spp.* Cette liste vise à encourager les gouvernements à mettre en place des politiques qui favorisent la recherche scientifique tant par les organismes financés par des fonds publics que par le secteur privé investissant dans la découverte de nouveaux antibiotiques.

Dans son rapport de 2019, Santé Publique France notait que près de 24 % des souches cliniques isolées de *P. aeruginosa* présentent une résistance aux carbapénèmes, 22 % à la ceftazidime et 1,6 % des souches sont pan-résistantes (résistance aux bêtalactamines dont carbapénèmes, aminosides, fluoroquinolones et colistine). Ces bactéries sont dotées de plusieurs mécanismes de résistance aux molécules antibiotiques tels que l'efflux, l'imperméabilité, la modification du site d'action ou l'inactivation enzymatique. Leurs apparitions peuvent être dues à des événements génétiques multiples tels que des mutations ou des transferts horizontaux de gènes de résistance et font suite à une pression de sélection due à l'administration répétée d'antibiotiques (Barbier and Wolff, 2010).

La présence de *P. aeruginosa* dans divers environnements, sa capacité à infecter une multitude d'hôtes, y compris les êtres humains, et sa résistance aux antibiotiques font de cette bactérie un pathogène complexe et extrêmement adaptable. Cette bactérie dispose de capacités uniques pour s'adapter à différents types d'environnements, que ce soit en cohabitation avec d'autres micro-

organismes ou en cas d'infection chez l'hôte. Parmi ces capacités, l'acquisition du fer est particulièrement remarquable.

2 Acquisition du fer par *P. aeruginosa*

2.1 Le fer, élément clé de la biochimie des êtres vivants

Le fer est le quatrième élément le plus répandu dans la croûte terrestre, représentant plus de 5 % de sa masse. Cet élément est remarquable par sa capacité de passer de l'état d'oxydation (0) à l'état (VI) (Sánchez *et al.*, 2017). Dans des conditions physiologiques, ce métal de transition existe principalement sous deux formes redox facilement interchangeables : la forme ferreuse réduite Fe^{2+} et la forme ferrique oxydée Fe^{3+} . Ces deux espèces sont toutes deux thermodynamiquement stables et cinétiquement réactives. En raison de ses qualités physico-chimiques, le fer peut être incorporé dans des protéines en tant que biocatalyseur ou transporteur d'électrons, ce qui lui confère une large gamme d'applications biologiques comme le transport et stockage de l'oxygène (hémoglobines, myoglobines), la respiration aérobie (ferredoxine, cytochrome P450), la photosynthèse (cytochrome C), la fixation d'azote (nitrogénase), la synthèse et la réparation de l'ADN (hélicases, nucléases, glycosylases, déméthylases), etc. Il est un élément essentiel à quasiment tous les organismes vivants, que ce soit les plantes, les bactéries, les animaux ou les êtres humains. Les rares exceptions connues à cela sont les bactéries du genre *Lactobacillus* ou encore *Borrelia burgoferi*, responsables de la maladie de Lyme, qui substituent au fer le cobalt ou le manganèse.

Paradoxalement à son rôle biologique majeur, le fer a une faible solubilité (de 10^{-9} à 10^{-10} M) à pH physiologique et en conditions aérobies (Ratledge, 2007). Il se retrouve alors dans l'état Fe^{3+} sous forme d'hydroxyde de fer, particulièrement peu biodisponible pour les organismes vivants car très peu soluble. De plus, la forme Fe^{2+} provoque la formation d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS), qui peuvent entraîner une variété de dommages biologiques également connus sous le terme de stress oxydatif (ciblant essentiellement les acides nucléiques, les acides aminés ou encore les lipides). La génération de ROS se fait *via* la réaction de Fenton (Fenton, 1894) :



Dans l'équation (1), le ROS généré est un radical hydroxyle ($OH \bullet$). Ainsi, les organismes doivent trouver un équilibre subtil entre acquérir le fer nécessaire à leur métabolisme et empêcher une concentration intracellulaire en fer excessive, ce qui définit le phénomène d'homéostasie du fer.

Dans le cas des bactéries, ces micro-organismes ont recours à cinq stratégies principales pour gérer l'homéostasie du fer (Andrews *et al.*, 2003). La première est l'import *via* un système à haute affinité,

qui permet à la bactérie de récupérer le fer dans son environnement, sous différentes formes. Puis, elles le stockent à l'intérieur de la cellule, de manière à disposer d'une source de fer pouvant être utilisée en cas de carence dans l'environnement. Elles peuvent aussi réguler l'expression des protéines contenant du fer et ainsi limiter la consommation de ce métal. Les bactéries mettent également en place des systèmes de résistance au stress oxydatif, qui incluent la dégradation des espèces réactives et la réparation des dommages causés. Enfin, elles disposent d'un système de régulation qui coordonne l'expression de ces différentes stratégies en fonction de la disponibilité en fer de leur milieu. Bien que ces stratégies constituent la base générale de l'homéostasie du fer chez les bactéries, leur mise en œuvre varie considérablement en fonction des conditions environnementales, de la niche écologique et de leur phylogénie. Au fil de l'évolution, *P. aeruginosa* en particulier a su se distinguer en mettant en place tout un arsenal de stratégies sophistiquées pour acquérir le fer dans un environnement où il est peu disponible. Sa stratégie principale repose sur l'utilisation de sidérophores.

2.2 Les sidérophores, molécules chélatrices de fer

2.2.1 Généralités

Les sidérophores (du grec *pherein* et *sideros* signifiant « porter le fer ») sont des molécules chélatrices organiques de faible poids moléculaire (de 150 à 2000 Da), qui possèdent une affinité élevée pour l'ion Fe^{3+} , allant de 10^{18} à $10^{49} M^{-1}$ (Hider and Kong, 2010). Le ferrichrome a été le premier sidérophore à être identifié. Il fut isolé à partir d'*Ustilago sphaerogena*, un champignon pathogène des plantes (Neilands, 1953). La même année, la mycobactine a été isolée de *Mycobacterium phlei* (Francis *et al.*, 1953). La découverte de ces deux sidérophores marqua le début d'une nouvelle ère dans la compréhension de l'acquisition du fer chez les micro-organismes. À ce jour, plus de 500 sidérophores différents ont été recensés et 270 sont caractérisés structurellement. Bien que ce type de molécules ait été identifié chez les bactéries, les champignons et les plantes, aucun n'est présent chez les mammifères (Boukhalfa and Crumbliss, 2002). La souche de référence PAO1 de *P. aeruginosa* produit deux sidérophores, la pyoverdine (PVD) et la pyochéline (PCH) (Albrecht-Gary *et al.*, 1994; Brandel *et al.*, 2012).

La synthèse des sidérophores est un processus enzymatique localisé principalement dans le cytoplasme des bactéries (Crosa and Walsh, 2002; Khan *et al.*, 2018; Miethke and Marahiel, 2007). Les enzymes impliquées exécutent une série de transformations séquentielles sur les précurseurs, générant ainsi la structure unique des sidérophores. Cette mécanique intracellulaire assure l'efficacité et la stabilité des sidérophores synthétisés.

2.2.2 Sélectivité et groupements chélateurs

La forte affinité et la sélectivité des sidérophores pour le Fe^{3+} sont dues à une sélection rigoureuse des groupements chimiques liant le métal, au nombre d'unités de liaison et à leur arrangement stéréochimique (Schalk *et al.*, 2012). Tous les sidérophores ont une affinité plus élevée pour le Fe^{3+} que pour le Fe^{2+} , une différence allant jusqu'à vingt ordres de grandeur pour le cas de la desferrioxamine B par exemple (Helman and Lawrence, 1989). Les principales fonctions chélatrices présentes chez les sidérophores sont : les catécholates (ex : Entérobactine), les hydroxamates (ex : Nocardamine), les α -hydroxycarboxylates (ex : Acide citrique), les α -aminocarboxylates (ex : Staphyloferrine B), les hydroxyphényloxazolines (ex : Mycobactine) ou encore les hydroxyphénylthiazolines (ex : Pyochéline) (Figure 2).

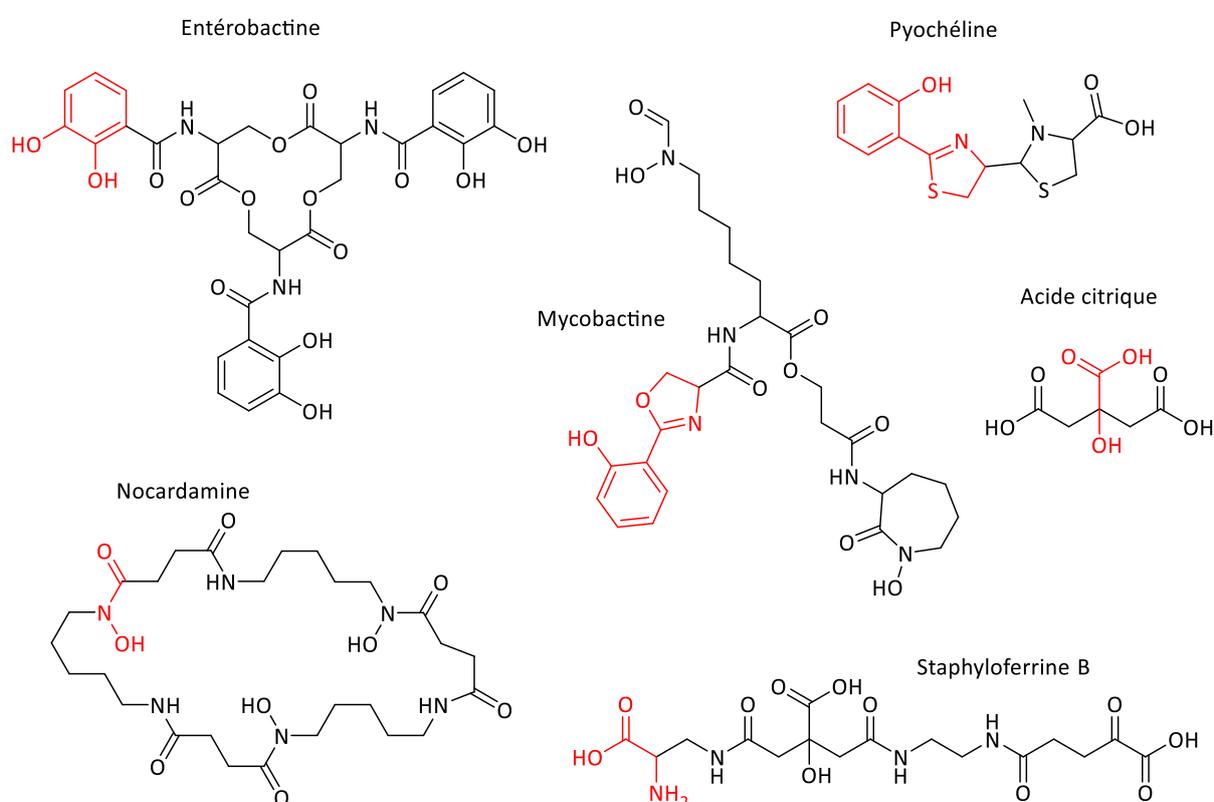


Figure 2 : Exemples de sidérophores et de leurs fonctions chélatrices, représentées en rouge.

Les atomes d'oxygène sont les meilleurs donneurs d'électrons et la géométrie la plus courante pour la coordination du Fe^{3+} est octaédrique avec six hétéroatomes disposés autour du fer (Boukhalfa and Crumbliss, 2002). Les atomes d'oxygène du sidérophore sont organisés en fonctions bidentées, telles que les catéchols, les hydroxamates et les α -hydroxycarboxylates. Chez certains sidérophores, l'azote est également impliqué en tant qu'atome donneur, mais dans de telles structures, l'affinité pour le Fe^{3+} tend à être plus faible (Hider and Kong, 2010). La structure hexadentate est la forme de sidérophore

la plus courante, avec un ou plusieurs types de fonctions différentes, attachés à des structures linéaires ou cycliques. Des sidérophores de plus faible denticité (tétradentate, tridentate et bidentate) sont également naturellement produits par des micro-organismes, mais ces chélateurs ne peuvent assurer à eux seuls une coordination complète du Fe^{3+} . Une complexation de multiples sidérophores de ce genre avec le fer est nécessaire. De manière générale, les sidérophores hexadentés ont une affinité pour le Fe^{3+} plus élevée que les sidérophores tétradentés, qui ont une affinité pour le fer plus élevée que les sidérophores bidentés (Albrecht-Gary and Crumbliss, 1998) (Tableau 1).

Sidérophore	Fonctions chélatrices	Denticité	K_a	Référence
Entérobactine	Catécholates	6	10^{49} M^{-1}	(Loomis and Raymond, 1991)
Protochéline	Catécholates	6	10^{43} M^{-1}	(Cornish and Page, 1998)
Pyoverdine	Catécholate / Hydroxamates	6	10^{32} M^{-1}	(Albrecht-Gary <i>et al.</i> , 1994)
Nocardamine	Hydroxamates	6	10^{32} M^{-1}	(Anderegg <i>et al.</i> , 1963)
Desferrioxamine B	Hydroxamates	6	10^{30} M^{-1}	(Anderegg <i>et al.</i> , 1963)
Ferrichrome	Hydroxamates	6	10^{29} M^{-1}	(Anderegg <i>et al.</i> , 1963)
Pyochéline	Hydroxyphenylthiazolone	4	10^{18} M^{-2}	(Brandel <i>et al.</i> , 2012)

Tableau 1 : Constantes d'affinité (K_a) de différents sidérophores pour le fer ferrique. Les sidérophores sont classés par K_a décroissante.

Les sidérophores jouent un rôle essentiel pour la survie et la croissance des bactéries en leur permettant de chélater le fer présent dans leur environnement. L'importation de ces complexes sidérophore-Fe à l'intérieur de la cellule bactérienne est assurée par des transporteurs dits TonB-dépendants (*TonB-Dependent Transporter*, TBDT), qui présentent une grande spécificité de liaison et ne transportent que des complexes sidérophore-Fe spécifiques (Noinaj *et al.*, 2010).

2.3 Les transporteurs de sidérophores de la membrane externe

2.3.1 Les transporteurs TonB-dépendants présents dans le génome de *P. aeruginosa*

Les TBDT sont formés d'une structure unique composée d'un tonneau β de 22 brins, d'un domaine globulaire appelé « bouchon » ou « plug », et de la TonB box (séquence de reconnaissance de la protéine TonB, conservée dans tous les transporteurs TonB-dépendants) (Noinaj *et al.*, 2010). Pour certains TBDT, un domaine additionnel existe, appelé domaine de signalisation, situé au niveau N-terminal de la protéine et pointant dans le périplasmique. Ce domaine est impliqué dans le mécanisme de régulation de l'expression du transporteur lui-même. Le tonneau β permet l'insertion dans la membrane externe et y forme un canal pour le transport des complexes. Ce canal est obturé par le domaine bouchon. La structure du TBDT PirA est présentée en Figure 3 en tant qu'exemple.

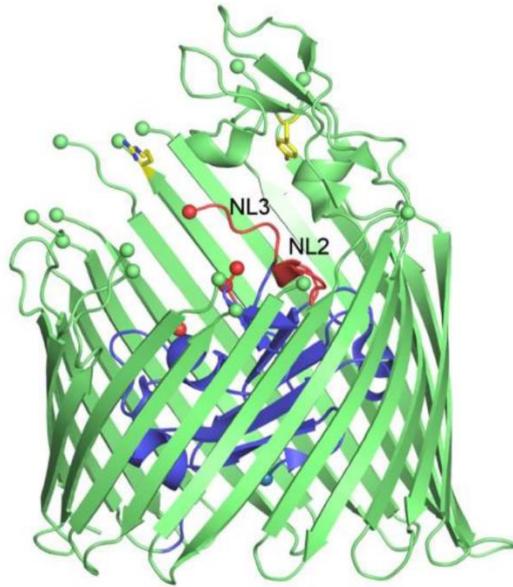


Figure 3 : Structure cristallographique de PirA (Moynié *et al.*, 2017). Le tonneau β à 22 brins est représenté en vert. La molécule est présentée telle qu'elle se trouve dans la membrane externe, avec des boucles extracellulaires s'étendant dans le milieu extracellulaire (en haut) et des boucles orientées vers le périplasma (en bas). Le domaine bouchon est représenté en bleu. Les boucles NL2 et NL3 (domaines putatifs de liaison au substrat) sont représentées en rouge. Les résidus susceptibles de faire partie du site de liaison du complexe sidérophore-Fe sont représentés par des bâtonnets jaunes. Les derniers résidus résolus des boucles flexibles sont représentés par des sphères.

Le génome de *P. aeruginosa* PAO1 code pour 35 TBDT (Tableau 2), dont certains n'ont été prédits qu'*in silico* en se basant sur la présence du domaine bouchon et de la structure du tonneau β (Cornelis and Bodilis, 2009). Au moins 15 TBDT sont impliqués dans l'acquisition du fer, 4 du zinc, 1 du cuivre et 1 du cobalt chez *P. aeruginosa*. De plus, il est possible que d'autres TBDT, dont les ligands n'ont pas encore été identifiés, participent également à l'acquisition de ces métaux. La prédominance de transporteurs de ce type impliqués dans l'acquisition du fer souligne l'importance métabolique de ce métal pour *P. aeruginosa*. Outre l'acquisition de métaux, les TBDT contribuent également au transport de sucres (Neugebauer *et al.*, 2005), et constituent des voies d'entrée pour certains bactériophages (Rabsch *et al.*, 2007) ou bactériocines (Behrens *et al.*, 2020).

Nom	Gène	Ligands	Référence
FiuA	PA0470	Ferrichrome	(Llamas <i>et al.</i> , 2006)
PirA	PA0931	Entérobactine, monocatéchols	(Ghysels <i>et al.</i> , 2005)
HxuA	PA1302	Hème	(Cornelis and Bodilis, 2009)
FemA	PA1910	Mycobatines, carboxymycobactines	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
FpvA	PA2398	Pyoverdine	(Poole <i>et al.</i> , 1993)
FoxA	PA2466	Desferrioxamine B, Nocardamine	(Llamas <i>et al.</i> , 2006)
PfeA	PA2688	Entérobactine	(Poole <i>et al.</i> , 1990)
HasR	PA3408	HasAp-hème	(Smith and Wilks, 2015)
FecA	PA3901	Citrate	(Marshall <i>et al.</i> , 2009)
FvbA	PA4156	Vibriobactine	(Elias <i>et al.</i> , 2011)
FpvB	PA4168	Pyoverdine, Desferrioxamine B, Ferrichrome	(Ghysels <i>et al.</i> , 2004)
FptA	PA4221	Pyochéline	(Ankenbauer and Quan, 1994)
PiuA	PA4514	Monocatéchols	(van Delden <i>et al.</i> , 2013)
ChtA	PA4675	Aérobactine, Schizokinen, Rhizobactine	(Cuív <i>et al.</i> , 2006)
PhuR	PA4710	Hème	(Smith and Wilks, 2015)
ZnuD	PA0781	Zn ²⁺	(Pederick <i>et al.</i> , 2015)
CirA	PA1922	Zn ²⁺	(Pederick <i>et al.</i> , 2015)
	PA2911	Zn ²⁺	(Pederick <i>et al.</i> , 2015)
CntO	PA4837	Pseudopaline	(Lhospice <i>et al.</i> , 2017)
OprC	PA3790	Cu ²⁺	(Yoneyama and Nakae, 1996)
BtuB	PA1271	Cobalamine	(Cornelis and Bodilis, 2009)
	PA0151		(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
	PA0192		(Cornelis and Bodilis, 2009)
	PA0434		(Cornelis and Bodilis, 2009)
PfuA	PA1322		(Cornelis and Bodilis, 2009)
	PA1365		(Cornelis and Bodilis, 2009)
	PA1613		(Cornelis and Bodilis, 2009)
SppR	PA2057		(Pletzer <i>et al.</i> , 2016)
	PA2070		(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
	PA2089		(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
	PA2289		(Cornelis and Bodilis, 2009)
OptO	PA2335		(Cornelis and Bodilis, 2009)
	PA2590		(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
	PA3268		(Cornelis and Bodilis, 2009)
OptI	PA4897		(Llamas <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 2 : Transporteurs TonB-dépendant de *P. aeruginosa* PAO1 classés par implication dans l'acquisition de type de métal (première colonne : rouge : fer, gris : zinc, vert : cuivre, bleu : cobalt, blanc : inconnu). Les TBDT dont la transcription est régulée par des facteurs σ /anti- σ sont mis en évidence en jaune, par des systèmes à deux composants en vert clair, par des régulateurs AraC en orange clair, par un régulateur de type IclR en bleu clair et ceux dont aucun système de régulation n'a été identifié en blanc.

2.3.2 Affinité d'un TBDT pour son ligand

La résolution de plus de 45 structures aux rayons X de TBDT a révélé que le site de liaison du complexe sidérophore-Fe est toujours situé sur la face extracellulaire du bouchon (Brillet *et al.*, 2007; Cobessi *et al.*, 2005; Ferguson *et al.*, 2002; Moynié *et al.*, 2019, 2017; Normant *et al.*, 2020). Cette règle s'applique à toutes les structures TBDT connues, quel que soit le complexe sidérophore-Fe reconnu et transporté. L'affinité d'un TBDT pour son ligand est en général de l'ordre du nM (Tableau 3). Cette liaison est indépendante de l'énergie : le TBDT est capable de lier le complexe sidérophore-Fe correspondant même en l'absence de force protomotrice, mais il n'y a pas de transport (Hoegy *et al.*, 2005). Pour certains TBDT, il existe un autre site de liaison se trouvant dans les boucles extracellulaires pouvant lier le ligand et le transférer au site situé au niveau du bouchon (Moynié *et al.*, 2019).

Chaque TBDT reconnaît et transporte un sidérophore spécifique, et dans certains cas, quelques sidérophores structurellement proches, mais rarement des sidérophores ayant des structures chimiques différentes, et surtout des groupements chélateurs différents. Par exemple, il a été prouvé que la liaison du complexe entérobactine-fer avec son transporteur PfeA n'est pas stéréospécifique, et elle ne tolère pas les modifications des groupements catéchols entourant le métal (Thulasiraman *et al.*, 1998). En revanche, le complexe est toujours reconnu et transporté même avec certaines modifications chimiques ailleurs que sur les groupements chélateurs. La taille et la forme du centre ferrique sont cruciales pour la liaison, tout comme la charge électrochimique générale du sidérophore.

TBDT	Ligand complexé au fer	K_d		Référence
FpvA	Pyoverdine	0,5 ± 0,1 nM		(Clément <i>et al.</i> , 2004)
FpvB	Pyoverdine	1,7 ± 0,34 μM		(Chan and Burrows, 2022)
	Ferrichrome	15 ± 1,9 nM		
	Desferrioxamine B	Site A	100 ± 50 nM	
Site B		270 ± 47 μM		
FptA	Pyochéline	0,54 ± 0,19 nM		(Mislin <i>et al.</i> , 2006)
FoxA	Desferrioxamine B	178 ± 16 nM		(Normant <i>et al.</i> , 2020)
	Nocardamine	100 ± 10 nM		
PfeA	Entérobactine	Site A	60 ± 40 nM	(Moynié <i>et al.</i> , 2019)
		Site B	155 ± 35 μM	

Tableau 3 : Constantes de dissociation (K_d) de différents transporteurs TonB-dépendant avec différents ligands complexés au fer. La liaison de la Desferrioxamine B avec FpvB et de l'Entérobactine avec PfeA peut se faire sur deux sites du transporteur, un avec une affinité élevée (Site A) et l'autre avec une faible affinité (Site B).

2.3.3 Transport du complexe sidérophore-Fe à travers la membrane externe

Le pore formé par le tonneau β des TBDT dans la membrane externe est complètement obstrué par le bouchon et ne permet pas la diffusion des complexes sidérophore-Fe sans un apport d'énergie pour

s'ouvrir. Pour initier le transport, des sidérophores ferriques provenant de l'espace extracellulaire se lient au site de liaison sur le bouchon, ce qui déclenche l'interaction de la protéine TonB avec la TonB box située à l'extrémité N-terminale des TBDT (Celia *et al.*, 2016). La protéine TonB, ancrée dans la membrane interne par une hélice hydrophobe, est en complexe avec les protéines ExbB et ExbD avec une stœchiométrie de 1:5:2 (TonB:ExbB:ExbD) (Figure 4) (Celia *et al.*, 2016). ExbB forme un pore transmembranaire qui est obstrué par ExbD.

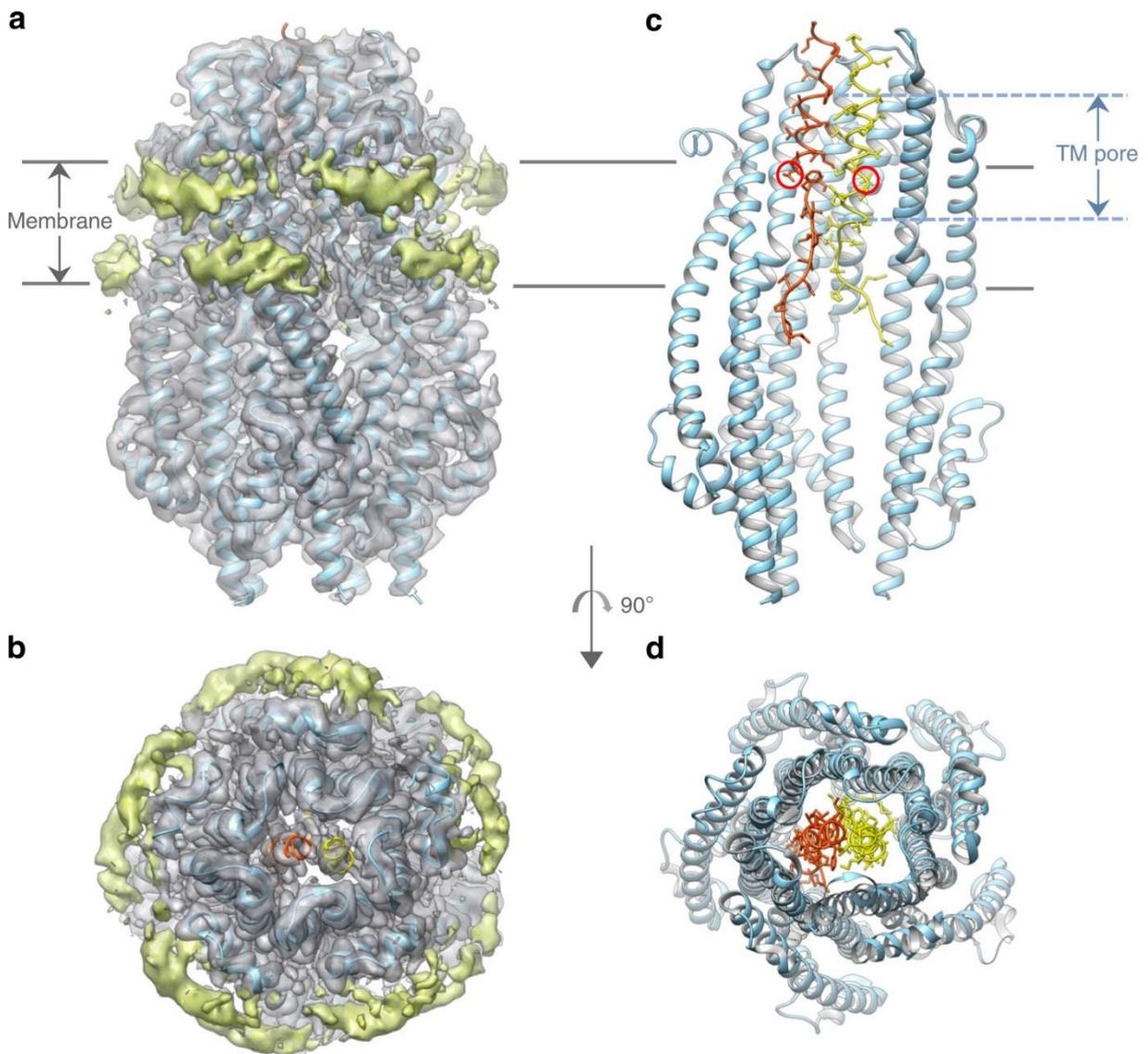


Figure 4 : Structure du complexe ExbB-ExbD dans des nanodisques lipidiques (Celia *et al.*, 2019). **a** Vue perpendiculaire à la membrane de la structure d'ExbB-ExbD établie par cryomicroscopie électronique (cryo-EM) représentée sous forme d'isosurfaces. La contribution de la protéine est colorée en gris, tandis que la contribution du nanodisque est colorée en vert. La limite du nanodisque permet d'estimer la position de la membrane lipidique. **b** Identique à (a) mais vu du périplasm. **c** Représentation sous forme de ruban du modèle atomique reconstruit, coloré en cyan pour le pentamère ExbB, en rouge et en jaune pour les deux domaines transmembranaires des deux sous-unités ExbD. Pour plus de clarté,

seules trois sous-unités ExbB sont représentées. Le pore transmembranaire formé par le pentamère ExbB est au-dessus du plan de la membrane. Les deux résidus aspartate essentiels en position 25 (Asp25) de l'ExbD sont représentés par des cercles rouges. **d** Identique à (c), vu du périplasma.

Le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD agit comme un moteur moléculaire qui exploite le gradient de protons de la membrane interne en formant un pore dans la membrane cytoplasmique (Celia *et al.*, 2019) (Figure 5). TonB fournit ensuite l'énergie au TBDT par mouvement de rotation (Ratliff *et al.*, 2022). La séquence de la TonB box est conservée et est unique à la famille des TBDT. Malgré le nombre important de TBDT ayant leur structure aux rayons X résolue, il n'est toujours pas clairement établi comment se forme un canal dans la structure du TBDT pour permettre le passage d'un complexe sidérophore-Fe. Des expériences de modélisation proposent un changement de conformation du domaine bouchon avec peut-être une partie qui se déplie plus ou moins dans le périplasma (Wiener, 2005).

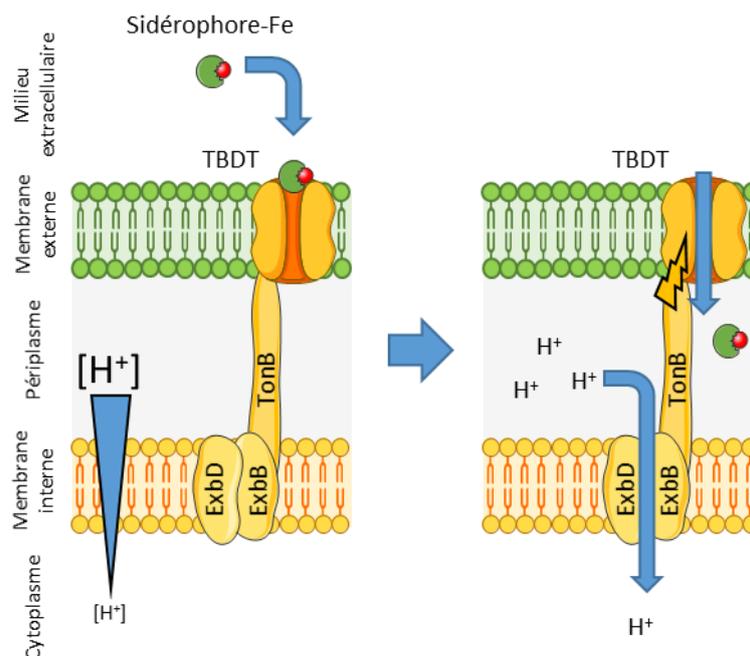


Figure 5 : Processus de transport TonB-dépendant. Après reconnaissance du ligand au niveau du site de liaison sur le TBDT, transduction du signal vers la TonB box, et interaction entre la TonB box et la partie périplasmique de TonB, la machinerie TonB-ExbD-ExbB transmet l'énergie générée par la différence de potentiel électrochimique du gradient de proton entre le cytoplasme et le périplasma, au TBDT pour permettre le transport du ligand.

La première structure d'un TBDT a été caractérisée en 1998 et depuis, de nombreux autres transporteurs ont été cristallisés et leurs structures résolues (au total, plus de 45 structures différentes ont été décrites) (Schalk *et al.*, 2012). Au-delà de l'étude approfondie de la structure et du mécanisme

des transporteurs TonB-dépendants de sidérophores, il est désormais essentiel d'approfondir notre compréhension de la régulation génétique qui orchestre leur expression chez *P. aeruginosa*. Cette régulation génétique complexe a un rôle déterminant dans la capacité de la bactérie à acquérir du fer, élément indispensable à sa survie et source de forte compétitivité entre les micro-organismes.

2.4 Devenir du complexe sidérophore-Fe dans le périplasma

Après avoir été transporté au travers de la membrane externe, certains sidérophores vont libérer le fer dans le périplasma, pour d'autres voies, le complexe sidérophore-Fe va aller jusqu'au cytoplasme et la libération du métal se fera dans ce compartiment cellulaire (Schalk and Guillon, 2013). La dissociation implique toujours une réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , et un chélateur puissant du Fe^{2+} pour déstabiliser le complexe sidérophore-Fe (Harrington and Crumbliss, 2009). L'efficacité de cette réduction dépend des potentiels redox des complexes sidérophore-Fe, qui varient en fonction de leur structure et de leurs groupements chélateurs (Harrington and Crumbliss, 2009). La réduction du fer sera associée dans certains cas à une modification chimique, voire une dégradation totale du sidérophore qui permet également de déstabiliser les complexes sidérophore-Fe.

Lorsque le fer est libéré du sidérophore dans le périplasma, il est transporté ensuite dans le cytoplasme par un transporteur à cassettes liant l'ATP (*ATP-binding cassette*, ABC) (Marshall *et al.*, 2009). Dans le cas d'une libération du fer dans le cytoplasme de la bactérie, le complexe sidérophore-Fe doit d'abord franchir la membrane interne. Ce transport implique soit un transporteur ABC (Hvorup *et al.*, 2007), soit des perméases dépendantes de la force proton motrice (Ó Cuív *et al.*, 2004).

Dans le cytoplasme, le Fe^{2+} est chélaté et transporté vers des protéines de stockage du fer ou d'autres métalloprotéines pour éviter la génération de ROS. Plusieurs composés, tels que le citrate et le glutathion, ont été identifiés comme ayant la capacité de remplir ce rôle de chélation et de transport (Hamed *et al.*, 1983; Hider *et al.*, 2021). Après avoir été stocké par des protéines comme la bactérioferritine, le fer devient disponible pour répondre aux besoins de la bactérie et remplir diverses fonctions métaboliques (Punchi Hewage *et al.*, 2020).

Chapitre II :

Systemes de régulation de *P. aeruginosa*
pour l'acquisition du fer

La régulation précise de l'expression génétique des gènes codant pour les TBDT des sidérophores et des autres gènes impliqués dans ces voies chez *P. aeruginosa* constitue un mécanisme essentiel pour assurer une acquisition efficace du fer. Compte tenu de la toxicité potentielle intracellulaire du fer, les bactéries mettent en place une régulation précise de sa concentration intracellulaire. Lorsque la bactérie présente une carence en fer et que ce nutriment est peu biodisponible dans son environnement, l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer est activée, et divers mécanismes et régulateurs entrent en jeu selon la voie d'absorption spécifique. Cette régulation s'effectue à différents niveaux, notamment au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Parmi les principaux acteurs de cette régulation, la protéine Fur (*Ferric Uptake Regulator*) joue un rôle de régulateur négatif, tandis que des facteurs σ à fonctions extracytoplasmiques (ECF- σ), des systèmes à deux composantes, des régulateurs de type AraC ou IclR contribuent à la régulation positive. Le *quorum sensing* (QS), un mécanisme de communication cellulaire, intervient également dans la régulation transcriptionnelle complexe. Au niveau post-transcriptionnel, les petits ARN interférents et la protéine Hfq jouent également un rôle important dans la régulation fine de l'expression des transporteurs de sidérophores.

1 Régulation transcriptionnelle

1.1 La protéine Fur

Le régulateur transcriptionnel de l'absorption et du stockage du fer, Fur, de *P. aeruginosa* est une protéine conservée dans la plupart des bactéries à Gram négatif. Fur existe sous forme de tétramères solubles stables dans les cellules de *P. aeruginosa* (Pérard *et al.*, 2016). Lorsque la concentration en fer augmente dans la cellule, le fer ferreux se lie à Fur, ce qui induit la dissociation du tétramère et la liaison de deux dimères de Fur à l'ADN au niveau des « Fur box », séquences palindromiques de 19 nucléotides. Cette liaison empêche la transcription du gène impliqué dans l'acquisition du fer, situé en aval de la Fur-box, en bloquant la liaison de l'ARN polymérase bactérienne (Troxell and Hassan, 2013) (Figure 6).

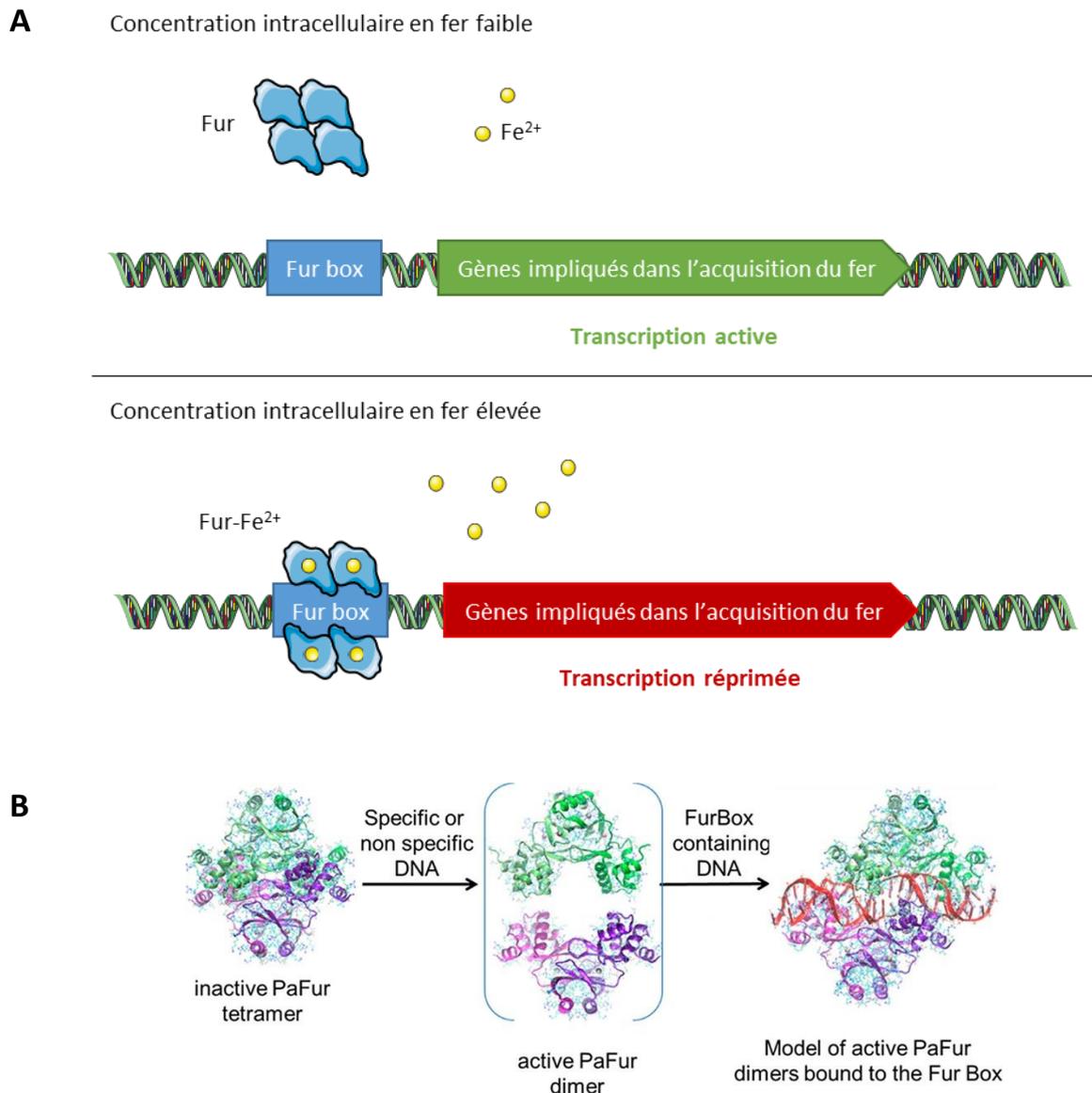


Figure 6 : Mécanisme de la régulation médiée par Fur. (A) Mécanisme général de la régulation de Fur selon la concentration intracellulaire en fer. (B) Mécanisme de la dissociation induite par l'ADN du tétramère de Fur de *P. aeruginosa* en dimères (Pérard *et al.*, 2016). Le tétramère ABCD est divisé en deux dimères AB et CD, les sous-unités sont représentées par leurs couleurs respectives : A en vert clair, B en vert, C en violet et D en magenta. Dans cette étude, la structure des dimères actifs a été réalisée avec des atomes de zinc, représentés par des sphères grises. Cet ion métallique est plus facile à manipuler que le Fe^{2+} , en raison de la stabilité de son état divalent, et est couramment utilisé pour les études *in vitro* de Fur. La structure du dimère de Fur liée à des ions ferreux est présumée similaire.

Des études transcriptomiques ont révélé que de nombreux gènes sont régulés par Fur chez *P. aeruginosa*, directement ou indirectement, ce qui en fait un régulateur central du métabolisme (van Oeffelen *et al.*, 2008). Par exemple, Fur contrôle l'expression génétique du régulateur PvdS, qui, lui-même, contrôle non seulement la transcription des gènes de biosynthèse de la PVD, mais aussi des gènes de virulence, tels que le gène codant pour l'exotoxine A ou la protéase extracellulaire PrpL.

(Llamas *et al.*, 2014; Visca *et al.*, 2007). Fur contrôle également la transcription des petits ARN régulateurs, PrrF1, PrrF2 et PrrH (Oglesby *et al.*, 2008), ainsi que des enzymes protégeant la bactérie contre les dégâts générés par les ROS (Troxell and Hassan, 2013). La Figure 7 illustre les interactions directes et indirectes connues de Fur avec les gènes codant pour les TBDT des voies d'acquisitions de fer endogènes et exogènes de *P. aeruginosa*. Une fois activée par une forte concentration cytoplasmique de fer, Fur agit donc comme un répresseur général de la transcription des gènes impliqués dans l'absorption du fer, que ce soit pour la biosynthèse des sidérophores ou des protéines des voies d'acquisition des complexes sidérophore-Fe.

L'activité de Fur se fait en réponse à la disponibilité du fer dans la cellule bactérienne, jouant ainsi un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie de ce métal. Cette protéine est donc importante pour le métabolisme de *P. aeruginosa*, mais pas essentielle. En effet, un mutant de délétion de *fur* a pu être obtenu. Son étude a montré que Fur n'est pas nécessaire à la croissance de *P. aeruginosa* en milieu liquide, à la formation de biofilms et à la virulence dans un modèle d'infection chez l'insecte (Pasqua *et al.*, 2017). À l'inverse, Fur est essentielle pour la croissance en milieu solide, les cellules dépourvues de Fur sont incapables de former des colonies (Pasqua *et al.*, 2017).

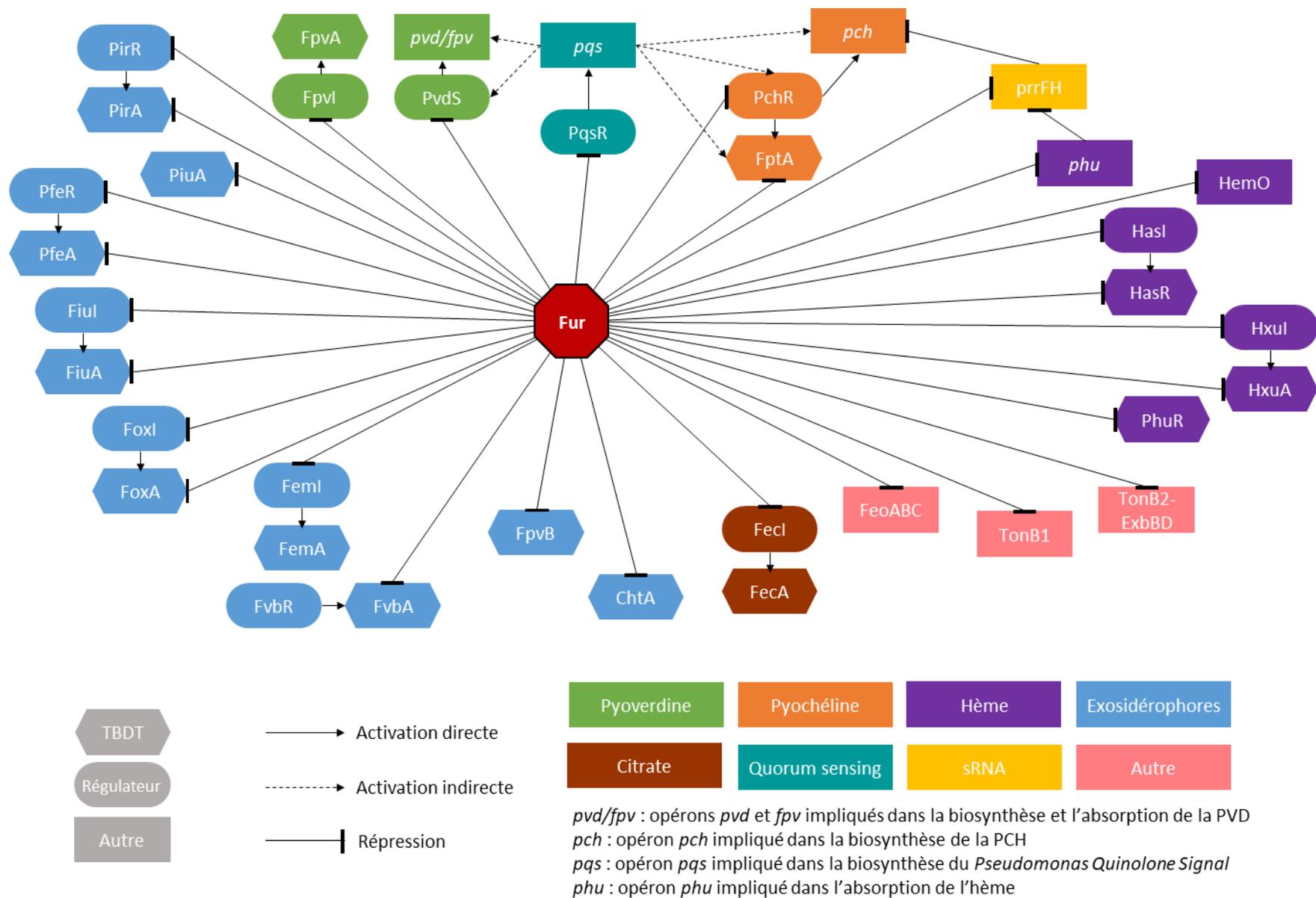


Figure 7 : Implication de Fur dans l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa*.

1.2 Les ECF- σ

Les ECF- σ forment le groupe le plus important et le plus diversifié des facteurs σ , famille de régulateurs transcriptionnels bactériens. Leur particularité est de répondre à des signaux extracellulaires. Ils font partie des systèmes de signalisation de la surface cellulaire (*Cell Surface Signaling, CSS*). Les ECF- σ sont composés d'un ou de plusieurs facteurs σ associés à un facteur anti- σ , qui a pour fonction de les séquestrer à la membrane interne (Otero-Asman *et al.*, 2019b). La première étape du mécanisme moléculaire des facteurs σ et anti- σ intervenant dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'acquisition d'un complexe sidérophore-Fe consiste en la liaison du sidérophore ferrique à son TBDT spécifique à la surface bactérienne. Cette interaction induit un changement de conformation du domaine de signalisation N-terminal du TBDT, permettant une interaction entre ce domaine et le facteur anti- σ en plus de celle entre la TonB-box du TBDT et la protéine TonB (Beare *et al.*, 2003; Brillet *et al.*, 2007). Cette interaction entraîne la protéolyse du facteur anti- σ par deux protéases différentes, Prc dans le périplasma et RseP dans la membrane cytoplasmique, ce qui inactive la fonction anti- σ . Le facteur σ est libéré dans le cytoplasme mais reste associé au fragment du facteur anti- σ . Tant que ce fragment n'est pas complètement dégradé par des protéases ATP cytoplasmiques telles que ClpXP, le facteur σ reste inactif (Braun *et al.*, 2022) (Figure 8). Ce mécanisme, appelé protéolyse intramembranaire régulée (*Regulated intramembrane proteolysis, RIP*), est très répandu chez les procaryotes comme les eucaryotes (Draper *et al.*, 2011).

Les ECF- σ appartiennent à une sous-famille des facteurs σ , la classe $\sigma 70$. Structuellement, ils sont partagés en quatre domaines conservés ($\sigma 1-4$), eux-mêmes subdivisés en plusieurs régions. La région $\sigma 4$ reconnaît l'élément -35 et la région $\sigma 2$ reconnaît l'élément -10 du promoteur du gène régulé (Figure 9). Les éléments -10 et -35 sont des séquences hexanucléotidiques relativement bien conservées dans les génomes bactériens. Leurs séquences consensus sont respectivement TATAAT (ou Pribnow box) et TTGACA. Ces deux éléments sont localisés à 10 et à 35 paires de base en amont du site du début de transcription (Hsu, 2002). Ils sont en général séparés par 17 pb, mais cet espacement peut varier de 15 à 19 pb. La force du promoteur sera déterminée par le degré de conservation des éléments -35 et -10 par rapport aux séquences consensus. Il a également été montré que les promoteurs dont l'espacement est de 17 pb sont plus efficaces que les promoteurs qui ont une longueur inter-hexamérique de 15 ou 19 pb (Hsu, 2002). Cet espacement module l'interaction du facteur σ avec le promoteur.

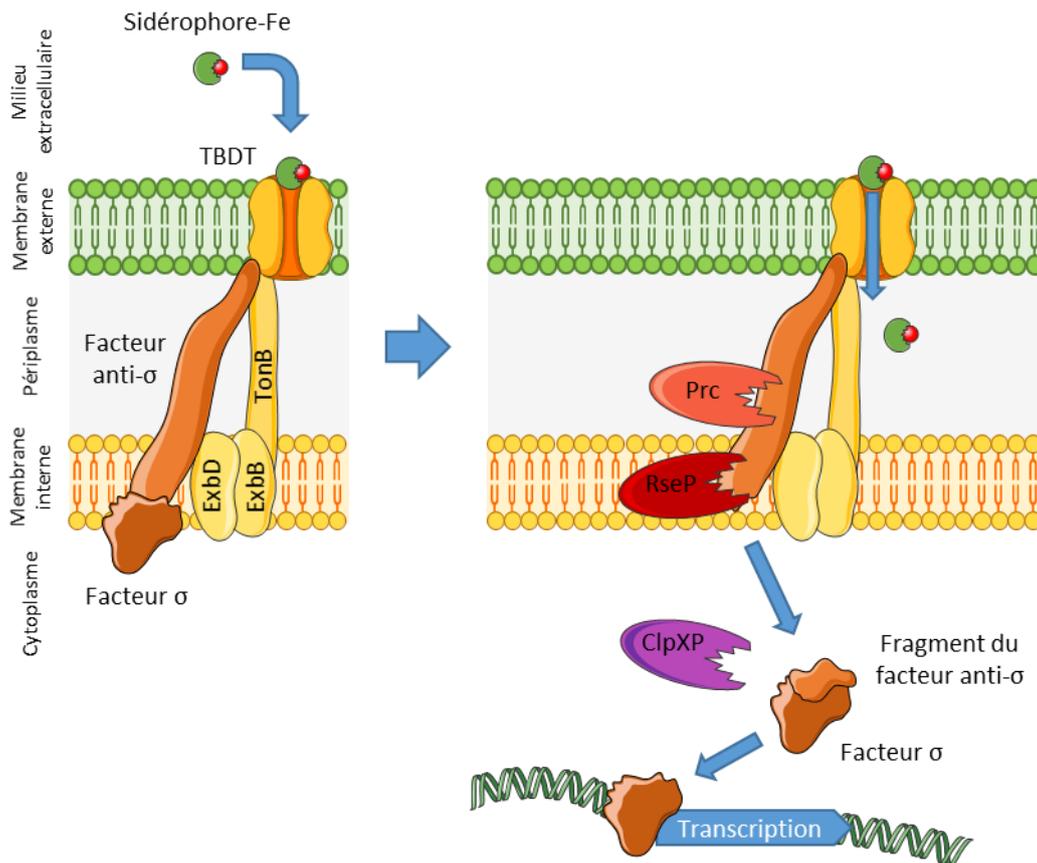


Figure 8 : Mécanisme de transduction du signal des ECF- σ avec protéolyse intramembranaire régulée.

Une comparaison des séquences reconnues par les ECF- σ chez différentes bactéries révèle que la séquence -35 et le nombre de paires de bases de l'espacement sont bien conservés (Enz *et al.*, 2003).

En revanche, la séquence de l'espacement entre les régions -35 et -10 et la séquence -10 présentent moins d'homologie. La diversité des séquences -10 explique probablement la coexistence de plusieurs membres de la sous-famille des ECF- σ chez la même espèce.

Une fois le promoteur reconnu, le facteur σ va permettre l'initiation de la transcription en recrutant spécifiquement l'ARN Polymérase (*RNA Polymerase*, RNAP) (Figure 9). Ainsi, la présence dans l'environnement de la bactérie d'un complexe sidérophore-Fe est transmise à un régulateur transcriptionnel spécifique localisé dans le cytoplasme par la liaison du complexe sidérophore-Fe à son TBDT à la surface de la bactérie, et ceci induit l'expression génétique de l'ensemble de la voie d'acquisition afin d'optimiser l'absorption du fer par ce sidérophore.

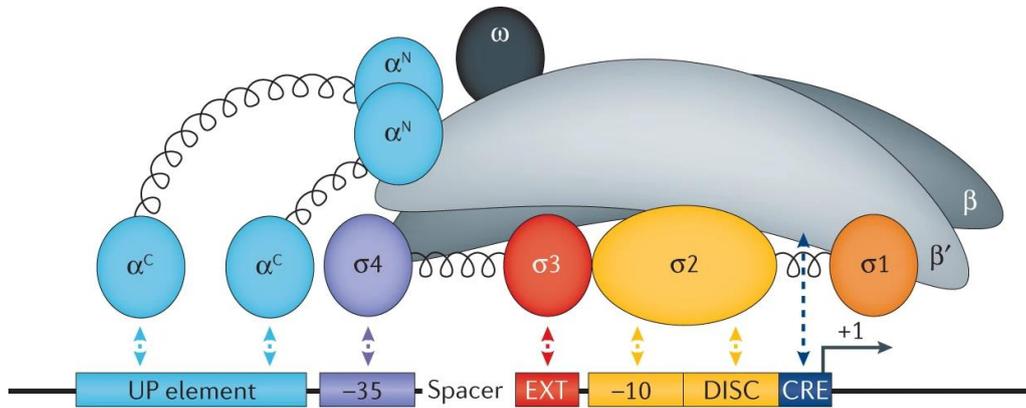


Figure 9 : Vue schématique de la liaison de l'holoenzyme RNAP aux régions promotrices (Mejía-Almonte *et al.*, 2020). La RNAP centrale (*core*) est composée de cinq sous-unités : 2 α , β , β' et ω . Les sous-unités α de la RNAP interagissent avec l'élément UP (*upstream promoter*) situé en amont de l'élément -35. L'enzyme centrale de la RNAP interagit de manière spécifique avec l'élément de reconnaissance central (CRE) juste en amont du codon initiateur du gène. Le facteur σ σ 70 contient quatre domaines fonctionnels (σ 1-4). Le domaine σ 2 reconnaît l'élément -10, et le domaine σ 4 interagit avec l'élément -35. L'élément -10 étendu (EXT) interagit avec le domaine σ 3. Certains promoteurs possèdent un élément appelé discriminateur (DISC), qui est reconnu par le domaine σ 2.

P. aeruginosa possède dans son génome 24 facteurs σ , 19 sont des ECF- σ , parmi eux 13 régulent l'expression de TBDTs et 8 de ces régulateurs sont impliqués dans l'acquisition du fer (Tableau 3) (Potvin *et al.*, 2008). Les couples de gènes codant pour les différents facteurs σ et anti- σ sont toujours en opéron et localisés juste en amont du gène du TBDT, exception faite pour *fpvI* et *pvdS* impliqués dans la régulation de la transcription des gènes de la voie d'import du fer par la PVD (Stover *et al.*, 2000b). Les autres facteurs σ présents dans le génome de *P. aeruginosa* sont impliqués dans une grande variété de processus, y compris la résistance au choc thermique, la virulence, la réponse au stress oxydatif, la biosynthèse de l'alginate ou la croissance cellulaire (Potvin *et al.*, 2008).

Facteur σ		Facteur anti- σ		TBDT		Référence
Nom	Numéro	Nom	Numéro	Nom	Numéro	
-	PA0149	-	PA0150	-	PA0151	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
FiuI	PA0472	FiuR	PA0471	FiuA	PA0470	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
HxuI	PA1300	HxuR	PA1301	HxuA	PA1302	(Otero-Asman <i>et al.</i> , 2019b)
-	PA1363	-	PA1364	-	PA1365	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
FemI	PA1912	FemR	PA1911	FemA	PA1910	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
-	PA2050	-	PA2051	SppR	PA2057	(Pletzer <i>et al.</i> , 2016)
-	PA2093	-	PA2094	-	PA2089	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
FpVI	PA2387	FpVR	PA2388	FpVA	PA2398	(Schulz <i>et al.</i> , 2015)
PvdS	PA2426	FpVR	PA2388	FpVA	PA2398	(Schulz <i>et al.</i> , 2015)
FoxI	PA2468	FoxR	PA2467	FoxA	PA2466	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
HasI	PA3410	HasS	PA3409	HasR	PA3408	(Otero-Asman <i>et al.</i> , 2019b)
FecI	PA3899	FecR	PA3900	FecA	PA3901	(Schulz <i>et al.</i> , 2015)
-	PA4896	-	PA4895	OptI	PA4897	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 4 : Facteurs σ et anti- σ de *P. aeruginosa* PAO1 associés à leur TBDT.

1.3 Le système à deux composantes

Les systèmes à deux composantes sont composés d'un senseur situé dans la membrane interne, et d'un régulateur localisé dans le cytoplasme (Figure 10). Le senseur, en général, une histidine kinase, possède deux domaines : un domaine d'entrée, qui détecte les stimuli environnementaux, et un domaine transmetteur, qui s'auto-phosphoryle après détection du stimulus (Trouillon *et al.*, 2021). Le senseur varie en longueur et en séquence d'acides aminés d'une histidine kinase à l'autre, ce qui lui confère une spécificité pour différents stimuli (Hoch, 2000). Il est composé en général d'un domaine de transduction du signal, d'un domaine appelé capteur cytoplasmique, d'un domaine à activité ATPase et d'un domaine histidine de dimérisation à activité phosphotransférase à (DHp). La détection du signal par le senseur induit une autophosphorylation au niveau d'un résidu histidine conservé dans son domaine transmetteur en C-terminal. Le groupe phosphoryle est ensuite transféré à un résidu d'acide aspartique conservé dans le domaine récepteur du régulateur, ce qui induit un changement de conformation conduisant à son activation (Rodrigue *et al.*, 2000). La phosphorylation de ce domaine entraîne généralement la formation d'homo-oligomères, le plus souvent de dimères. La dimérisation permet au régulateur de présenter une affinité accrue pour des motifs de liaison spécifiques à l'ADN, qui sont généralement des répétitions directes ou inversées de bases azotées (Zschiedrich *et al.*, 2016). Le domaine de liaison du régulateur à l'ADN possède une structure de type « hélice ailée » (Stock *et al.*, 2000). Une hélice de reconnaissance de la protéine interagit avec le sillon majeur de l'ADN et des

boucles externes, ou « ailes », entrent en contact avec le sillon mineur. L'activation transcriptionnelle implique une interaction avec la sous-unité α de la RNAP (Stock *et al.*, 2000).

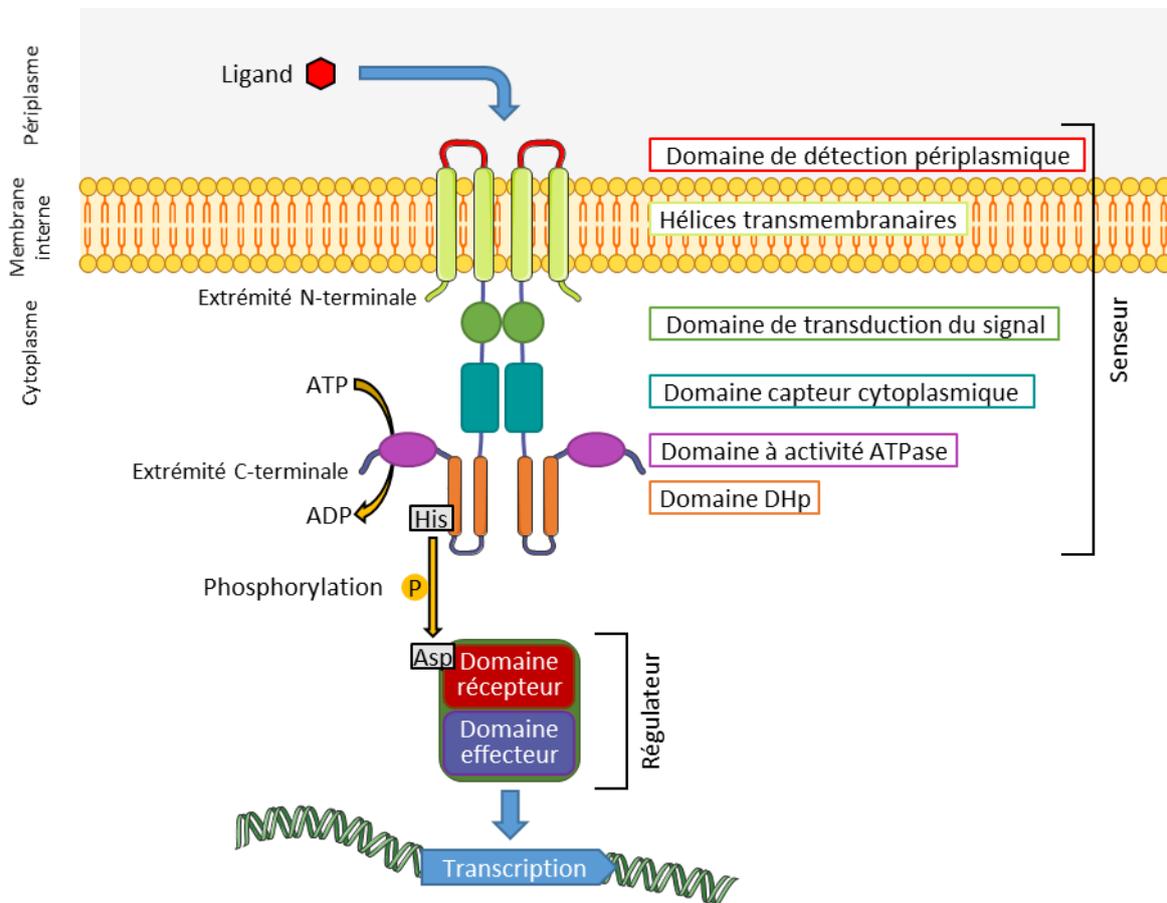


Figure 10 : Mécanisme d'un système de signalisation à deux composantes. Le senseur histidine kinase (Senseur) détecte le signal environnemental à l'aide du domaine de détection qui est relié au domaine de transduction du signal, à un domaine capteur cytoplasmique, à un domaine à activité ATPase et à un domaine histidine de dimérisation à activité phosphotransférase (DHp). Le résidu histidine conservé (His) du Senseur transfère le phosphate au résidu aspartate conservé (Asp) du domaine récepteur de son régulateur de réponse (Régulateur). Le domaine effecteur du Régulateur phosphorylé se lie à sa cible et régule l'expression des gènes.

L'analyse du génome de *P. aeruginosa* a permis d'identifier le plus grand nombre de gènes putatifs codant pour des systèmes de régulation à deux composantes de tous les génomes bactériens séquencés à ce jour (64 et 63 codant respectivement pour des régulateurs de réponse et des histidine kinases) (Rodrigue *et al.*, 2000). Ce type de régulateur est impliqué dans de nombreux processus biologiques différents : la chimiotaxie, la respiration, l'acquisition du fer, la régulation du niveau de phosphate, la production de pili, l'adhésion, la production d'alginate, la résistance à la polymyxine B ou la production de facteurs de virulence (Rodrigue *et al.*, 2000).

Deux systèmes à deux composantes, PfeS/PfeR et PirS/PirR, sont connus pour être impliqués chez *P. aeruginosa* dans la régulation de la transcription des gènes codant pour les TBDTs et d'autres protéines impliquées dans les voies d'acquisition du fer. De la même façon que les gènes des ECF- σ , chaque couple de gènes codant pour un senseur/régulateur est disposé en opéron, et cet opéron se situe juste en amont du gène codant pour le TBDT impliqué (Stover *et al.*, 2000b). Le système PfeS/PfeR active la transcription de l'opéron de *pfeA* et *pfeE* (codant respectivement pour un TBDT et une estérase) (Charles R. Dean and Poole, 1993). Ces deux gènes sont impliqués dans l'acquisition du fer par des sidérophores à groupements catéchols tels que l'entérobactine, la protochéline ou l'azotochéline (Gasser *et al.*, 2016). Le système PirS/PirR active la transcription de *pirA*, gène codant pour un TBDT impliqué dans l'absorption du fer chélaté par les monocatéchols (Ghysels *et al.*, 2005; Luscher *et al.*, 2022; Perraud *et al.*, 2022). Pour activer ce système de régulation, le complexe ferrique-sidérophore doit pénétrer dans le périplasme bactérien *via* son TBDT spécifique et se lier au senseur associé au TBDT qui se trouve dans la membrane interne (Gasser *et al.*, 2021).

1.4 Les régulateurs de type AraC

La famille des régulateurs transcriptionnels de type AraC constitue l'un des plus grands groupes de protéines régulatrices chez les bactéries. Ces régulateurs sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle d'une variété de processus cellulaires chez les bactéries Gram-négatives, y compris le métabolisme du carbone, les réponses au stress et la virulence (Yang *et al.*, 2011). L'archétype bien caractérisé de cette famille est l'activateur AraC de l'opéron *araBAD*, qui est impliqué dans le métabolisme du L-arabinose chez *E. coli*. L'activité de cette protéine dépend de sa liaison avec l'arabinose. Les représentants de cette famille possèdent un domaine C-terminal hautement conservé contenant deux motifs hélice-tour-hélice responsables de la liaison à l'ADN, et un domaine N-terminal variable, appelé domaine de liaison au ligand ou domaine de réponse, impliqué dans les interactions avec les ligands (Kotecka *et al.*, 2021). Le mécanisme de contrôle transcriptionnel des régulateurs de type AraC comporte deux états (Fernandez-López *et al.*, 2015) (Figure 11). Sous sa forme apo, le régulateur de type AraC forme un dimère et se lie au promoteur par l'intermédiaire de deux sites de liaisons distants. Dans cet état, l'ADN forme une boucle, ce qui empêche l'initiation de la transcription. La liaison du ligand au régulateur de type AraC produit un changement allostérique de la protéine qui oblige le régulateur à se lier à deux sites adjacents, ce qui détend la boucle d'ADN. Ce nouvel état permet le recrutement de l'ARN polymérase et favorise ainsi la transcription.

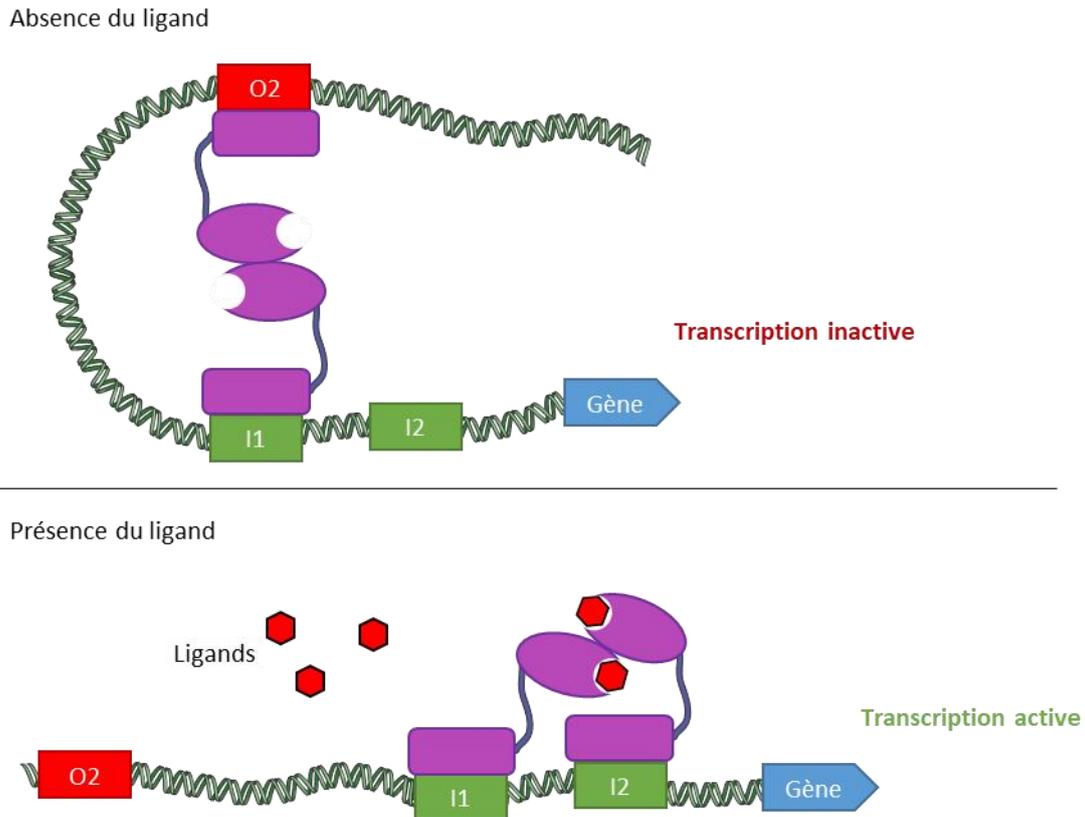


Figure 11 : Mécanisme de régulation de la transcription par les régulateurs de type AraC. Dans l'état de répression, le régulateur de type AraC (en violet) est lié aux sites distants I1 et O2 au niveau du promoteur du gène, formant une boucle d'ADN qui empêche l'initiation de la transcription. En présence du ligand, chacun des monomères du régulateur de type AraC se lie aux sites adjacents I1 et I2, ce qui libère la boucle d'ADN et favorise le recrutement de l'ARN polymérase, activant la transcription.

Parmi les 62 régulateurs de type AraC du génome de *P. aeruginosa* PAO1, PchR agit comme un activateur transcriptionnel des gènes impliqués dans la voie d'absorption du fer par la PCH. Ce mécanisme de régulation implique que la PCH ferrique soit transportée dans le cytoplasme bactérien et interagisse avec PchR. Ce dernier se lie ensuite aux régions promotrices PchR-box pour activer la transcription des gènes codant pour les protéines de la voie d'absorption du fer dépendante du sidérophore la pyochéline (Figure 11) (Cunrath *et al.*, 2020; Michel *et al.*, 2005). Ce mécanisme active la boucle d'autorégulation positive de la PCH.

1.5 Les régulateurs de type IclR

La famille de régulateurs de type IclR porte le nom du membre de ce groupe qui a été le mieux caractérisé au niveau génétique et biochimique, la protéine IclR. Cette protéine contrôle le cycle du glyoxylate, voie métabolique dérivée du cycle de Krebs, chez *E. coli*. Contrairement à d'autres familles de régulateurs dans lesquelles on trouve principalement des activateurs ou des répresseurs, les

membres de la famille lclR comprennent des répresseurs, des activateurs et des protéines ayant un double rôle : répresseur pour certains gènes et activateur pour d'autres (Molina-Henares *et al.*, 2006). Comme les régulateurs de type AraC, les régulateurs de type lclR contiennent un motif de liaison à l'ADN en forme d'hélice-tour-hélice dans le domaine N-terminal. Le seul régulateur de type lclR connu pour être impliqué dans l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa* est FvbR. Le mécanisme exact de cette régulation est encore incertain. Il a été supposé que FvbR agisse comme un répresseur en inhibant la transcription de *fvbA*, gène codant pour le TBDT de la vibriobactine complexée au fer. La présence de vibriobactine liée à FvbR peut abolir cette répression (Elias *et al.*, 2011).

1.6 Le QS

Le QS est l'un des principaux mécanismes de régulation globale des bactéries (Strateva and Mitov, 2011). Il est souvent considéré comme un mécanisme de communication qui permet aux bactéries individuelles de coordonner leur comportement en sécrétant et en détectant des signaux chimiques appelés auto-inducteurs. En général, le QS a lieu dans des communautés à forte densité cellulaire où la concentration de ces molécules est élevée. Lorsqu'une concentration seuil d'auto-inducteurs est atteinte, leurs interactions avec des facteurs de transcriptions conduisent à l'activation d'auto-inducteurs synthèses spécifiques. Ce mécanisme constitue une boucle de rétroaction positive, augmentant encore le signal. Ces facteurs de transcriptions régulent également de nombreux autres gènes lors de la détection des auto-inducteurs, souvent impliqués dans la virulence (production de protéases, exotoxine A, pyocyanine, sidérophores ou hémolysines) et nécessaires à l'invasion tissulaire et à la dissémination de *P. aeruginosa*. Ces facteurs, produits de manière coordonnée par les bactéries, peuvent permettre d'outrepasser les mécanismes de défense de l'hôte au cours d'une infection aiguë. Le QS peut également contribuer à la formation de biofilms et participe ainsi à la pathogenèse de l'infection chronique (Lee and Zhang, 2015).

P. aeruginosa possède quatre systèmes QS qui interagissent entre eux tout en fonctionnant de manière indépendante : les systèmes QS Las, Rhl, celui basé sur la quinolone, ainsi que celui basé sur les oxylipines (*Oxylipin-Dependent quorum-sensing System*, ODS). Chacune de ces voies de régulation répond à des stimuli externes spécifiques et implique les principaux facteurs de transcription LasR, RhIR, PqsR et OdsR et leurs synthèses autoinductrices cibles respectives : LasI, RhII, PqsABCDH et OdsAB (García-Reyes *et al.*, 2020; J. Lin *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2022). Le système Las réagit par la présence de N(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (OdDHL) et le système Rhl par le N-butyryl-L-homosérine lactone (BHL). LasR et RhIR se dimérisent après avoir lié leurs molécules de signal, ce qui leur permet d'interagir aux *las box* ou *rhl box* conservées dans les promoteurs des gènes cibles, déclenchant ainsi leur transcription (Lee and Zhang, 2015). Le système QS basé sur les quinolones

s'active grâce au 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, appelé *Pseudomonas quinolone signal* (PQS), reconnu par PqsR. De manière similaire, certaines oxylipines sont reconnues par OdsR dans le cas de l'ODS, c'est le cas de l'acide (10S)-hydroxy-(8E)-octadécanoïque et de l'acide 7S,10S-dihydroxy-(8E)-octadécanoïque (Martínez *et al.*, 2022) (Figure 12).

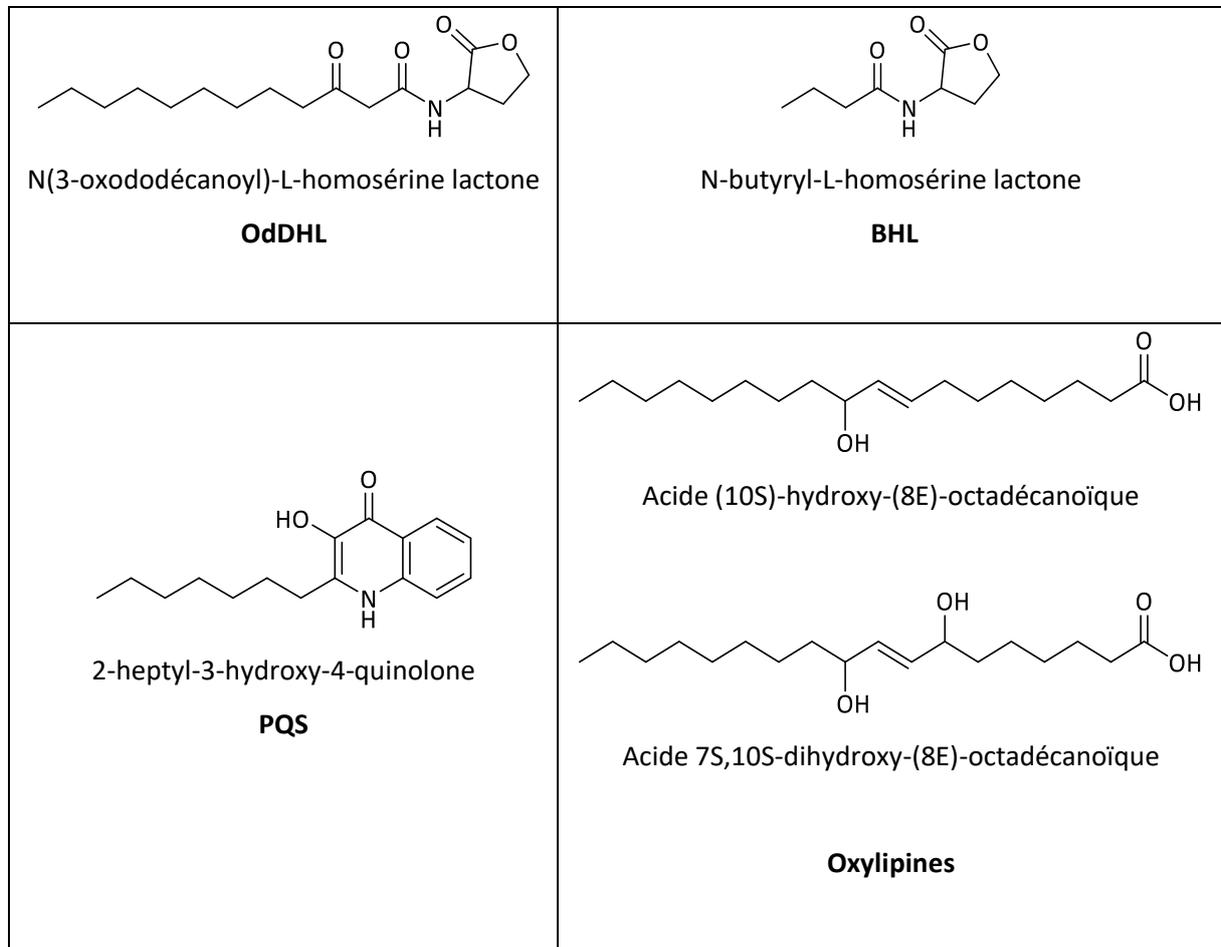


Figure 12 : Structures des molécules signal (auto-inducteurs) du QS.

Une régulation croisée existe entre les différents systèmes QS : LasR active à la fois les systèmes Rhl, Pqs et Ods, RhlR inhibe Pqs, et PqsR active Rhl et Ods (Figure 13). Ces systèmes de signalisation créent un réseau global de régulation et contrôleraient l'expression de près de 12 % du génome de *P. aeruginosa* (García-Reyes *et al.*, 2020).

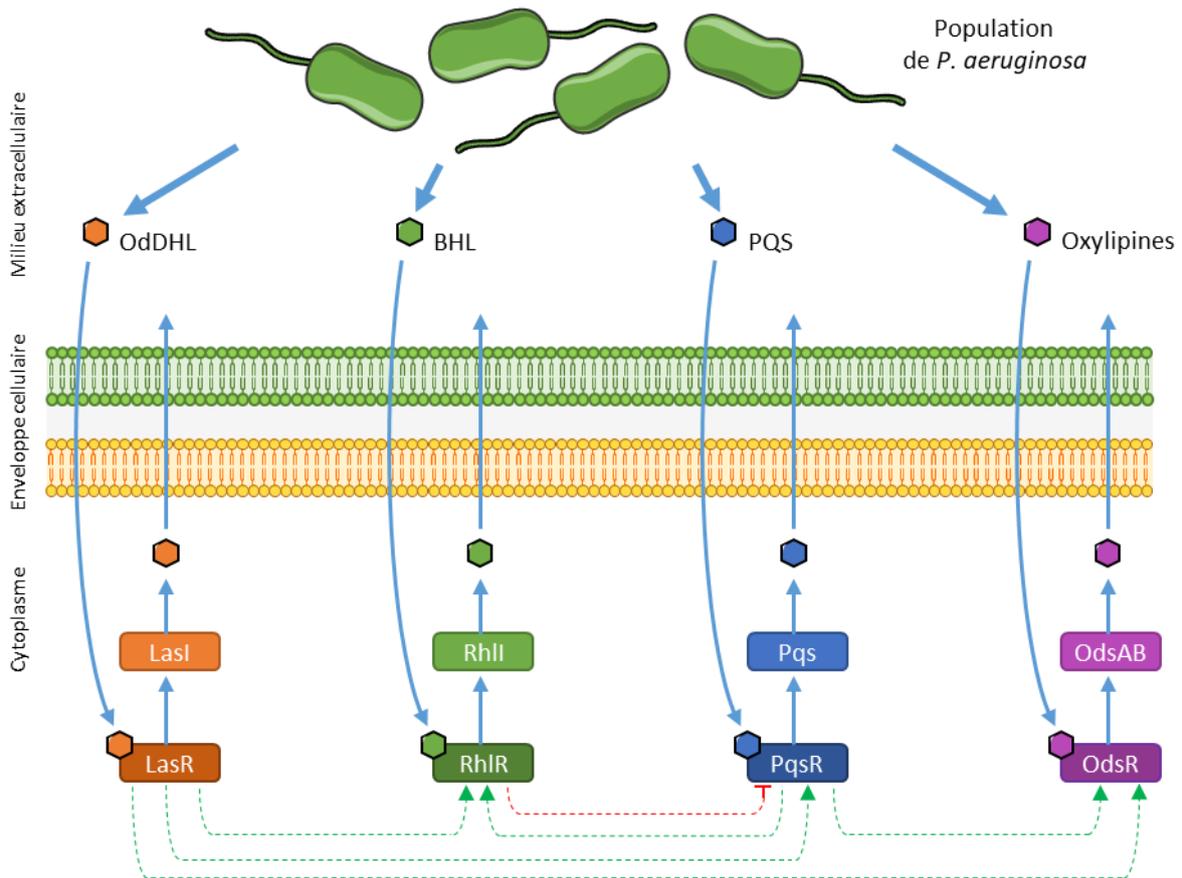


Figure 13 : Les quatre voies du QS (Las, Rhl, Pqs et OxyIipines). De haut en bas : population de *P. aeruginosa*, auto-inducteurs (OdDHL, BHL, PQS, OxyIipines), synthèses des auto-inducteurs (LasI, PhII, Pqs : PqsABCDH, OdsAB), facteurs de transcription liés à son auto-inducteur (LasR, RhIR, PqsR, OdsR). Les interactions régulatrices entre les différentes voies sont indiquées par des flèches en pointillés.

Chacune de ces voies de régulation répond à des stimuli externes spécifiques, tels que la carence en source de carbone, l'hypoxie, le choc thermique, le stress oxydatif, le stress dû aux métaux lourds ou le stress salin pour le système Las, le choc thermique, le stress oxydatif, le stress dû aux métaux lourds ou le stress salin pour le système Rhl, et la carence en fer et l'hypoxie pour le système Pqs. Les stimuli externes activant le système des oxyIipines restent encore à être élucidés.

PQS est la principale molécule dont les activités régulatrices ont été décrites, elle est capable de réguler l'expression d'au moins 182 gènes du génome de *P. aeruginosa* (García-Reyes *et al.*, 2020). Les gènes régulés positivement par PQS comprennent ceux impliqués dans le système de sécrétion de type III tels que *pcrV*, *pcrH*, *exsC*, *exsB* et également *exoS* et *spcS* (Rampioni *et al.*, 2016), ce qui indique l'importance de PQS dans la virulence de *P. aeruginosa*. De plus, de nombreux gènes régulés par PQS sont liés à la carence en fer. PQS induit l'expression des gènes liés aux systèmes d'acquisition du fer tels que l'opéron *pchABCD* et le gène *pchF* impliqués dans la biosynthèse de la PCH, ainsi que *fptA* le

gène codant pour le TBDT important la PCH ferrique. *pvdJ*, *pvdA* et *pvdD*, des gènes impliqués dans la biosynthèse de la PVD, et les gènes codant pour les régulateurs *pvdS* et *pchR* sont également induits par PQS (Rampioni *et al.*, 2016).

1.7 Autres régulateurs transcriptionnels

Il existe plusieurs autres systèmes de régulation qui contrôlent directement ou indirectement l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa*, comme par exemple le produit du gène PA2384, qui est un homologue de Fur, et dont le locus se situe juste en aval de gènes de la voie de biosynthèse et d'acquisition de la PVD. L'expression du gène PA2384 est induite en cas de carence en fer et est favorisée par PvdS (Ochsner *et al.*, 2002). L'absence de PA2384 réduit fortement l'expression de plusieurs gènes sensibles au fer (gènes de biosynthèse et de transport de la PVD et de la PCH, gènes de transport et d'utilisation de l'hème, et autres gènes d'absorption du fer), tandis qu'elle induit l'expression des gènes codant pour des protéines séquestrant le fer (Zheng *et al.*, 2007). Par conséquent, le PA2384 semble contrôler l'homéostasie du fer en favorisant l'acquisition du fer et en inhibant son stockage, bien qu'il reste à déterminer s'il fonctionne comme un régulateur direct ou indirect.

Le système à deux composantes AlgZR de *P. aeruginosa* contrôle l'homéostasie du fer en modulant la transcription de *pvdS*, du petit ARN interférent *prfF2*, de *hasI* et du régulateur de type Fur PA2384 (Little *et al.*, 2018). Cette régulation est influencée par l'état de croissance et la source de carbone plutôt que par la teneur en fer. De même, le réseau de signalisation Gac/Rsm, une cascade de régulation multikinase, contrôle la biosynthèse et l'absorption des sidérophores en modulant l'expression des gènes régulateurs *pvdS* et *pchR* (Peng *et al.*, 2020). L'activation du système Gac favorise le mode d'infection chronique en permettant la traduction des gènes impliqués dans la formation du biofilm et en inhibant celle des gènes impliqués dans la motilité, spécifiques à l'infection aiguë (Peng *et al.*, 2020).

2 Régulation post-transcriptionnelle

2.1 Les petits ARN interférents

Les petits ARN interférents (*small regulatory RNA*, sRNA) bactériens sont des sRNA non traduits de 50 à 400 pb. Les sRNA reconnaissent les ARN messagers (*messenger RNA*, mRNA) grâce à leur séquence d'amorçage, qui initie l'appariement des bases (Waters and Storz, 2009). Ils sont codés à un locus différent de leurs cibles et ils présentent un appariement imparfait avec ces dernières, ce qui leur permet de cibler et réguler différents mRNA. La plupart des sRNA agissent en s'appariant avec un

mRNA empêchant le recrutement du ribosome et inhibant par conséquent la traduction du mRNA (Bouvier *et al.*, 2008). Les sRNA peuvent également activer la traduction en supprimant la structure inhibitrice du mRNA qui obstrue le site de liaison du ribosome (Wagner and Romby, 2015). D'autres mécanismes de régulation comprennent l'induction de la dégradation du mRNA avec le recrutement d'une ribonucléase (Bandyra *et al.*, 2012).

Différents types de sRNA ont été identifiés, ceux qui ont leur propre promoteur (soit dans les régions intergéniques, soit directement à l'intérieur des gènes, dans la même orientation ou dans l'orientation opposée) et les sRNA synthétisés à partir des mRNA (générés à partir de leur extrémité 5' ou 3') (Wagner and Romby, 2015). La plupart des sRNA ne sont pas exprimés de manière constitutive mais sont généralement induits dans des conditions de stress et jouent un rôle dans la régulation de la réponse à ce stress (Hoe *et al.*, 2013). Trois sRNA appelés PrrF1, PrrF2 et PrrH interviennent dans le cas de l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa*. La synthèse de ces sRNA, régulée par Fur, est activée en réponse à un manque de fer (Oglesby *et al.*, 2008). Ils provoquent la dégradation du mRNA et des protéines ferriques non essentielles, et ils activent les mécanismes de stockage du fer (Holmqvist and Wagner, 2017). Les sRNA PrrF jouent un rôle dans de nombreux autres processus, notamment la motilité, la production de molécules de QS, la virulence et la formation de biofilms. Ces sRNA sont codés par deux gènes hautement homologues, *prfF1* et *prfF2*, qui sont situés en tandem sur le génome de *P. aeruginosa*. Cette disposition permet l'expression PrrH, un troisième sRNA chevauchant *prfF1*, *prfF2* et leur séquence intergénique. Alors que les gènes *prfF1* et *prfF2* sont codés par toutes les *Pseudomonas*, cette disposition en tandem avec l'expression de PrrH est unique à *P. aeruginosa* et contribue potentiellement à la forte capacité d'adaptation de cette bactérie (Reinhart *et al.*, 2015). PrrH régule un sous-ensemble spécifique de gènes impliqués dans l'absorption et le métabolisme de l'hème, et d'autres processus cellulaires par le biais de sa séquence unique dérivée de la région intergénique *prfF1-prfF2* (Reinhart *et al.*, 2015).

Le locus *prfF1-prfF2* se situe directement en aval de l'opéron *phu*, système d'acquisition de l'hème de *P. aeruginosa*. Il a été montré que le régulateur PhuS en forme apo se lie spécifiquement au promoteur de *prfF1* et module l'expression de PrrF1 et PrrH en fonction du flux d'hème extracellulaire. L'équilibre entre apo-PhuS et holo-PhuS modulerait l'expression relative de PrrH (Wilson *et al.*, 2021). Une étude récente montre que l'hème et PrrH affecteraient la biosynthèse de la PCH en interagissant avec *pchE* (Hoang *et al.*, 2023). Ces résultats montrent que l'hème est une source de fer préférée par *P. aeruginosa* dans des conditions de croissance statique, ce qui favorise l'initiation du biofilm, comme lors d'infections chroniques. Cette étude souligne la place importante des sRNA dans l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa* et montre que ses différentes voies d'acquisition du fer peuvent être étroitement liées.

2.2 La protéine de liaison à l'ARN Hfq

Hfq est une protéine de liaison à l'ARN, et est présente dans la plupart des espèces bactériennes. Elle facilite l'appariement des sRNA à leurs mRNA cibles, modulant ainsi leur traduction et leur stabilité. En complexe avec la protéine Crc, Hfq peut aussi interagir avec les mRNA cibles de manière indépendante des sRNA. Hfq régule des centaines de gènes, notamment impliqués dans la synthèse de facteurs de virulence, le métabolisme du carbone, la résistance aux antibiotiques, ainsi que la transition entre le mode de vie planctonique et le mode de vie en biofilm (Janssen *et al.*, 2020; Linares *et al.*, 2010; Pei *et al.*, 2019; Santoro *et al.*, 2023; Sonnleitner and Bläsi, 2014). Une étude transcriptomique portant sur Hfq a montré que cette protéine a un rôle important dans l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* (Sánchez-Hevia *et al.*, 2018). En effet, Hfq est capable de contrôler les niveaux des sRNA PrrF1, PrrF2 et PrrH, en les protégeant de la dégradation par les ribonucléases. Hfq influencerait également d'autres éléments du métabolisme du fer chez *P. aeruginosa*, par exemple certains facteurs transcriptionnels, affectant ainsi la production des TBDT et la biosynthèse des sidérophores. La participation de Hfq à l'homéostasie du fer, ainsi que son influence rapportée sur la tolérance au stress, la répression des catabolites et le QS, font de cette protéine un régulateur central dans le réglage de la physiologie cellulaire de *P. aeruginosa*.

Chapitre III :
Voies d'acquisition du fer chez
P. aeruginosa

Au cours de l'évolution, *P. aeruginosa* a développé un arsenal de stratégies complexes et finement régulées pour acquérir le fer dans des milieux où la compétition pour ce métal est rude. En plus de produire ses propres sidérophores, *P. aeruginosa* peut utiliser d'autres molécules chélatrices de fer produites par divers organismes.

1 Voies d'acquisition du fer impliquant des sidérophores endogènes

1.1 Voie de la PVD

1.1.1 Biosynthèse et sécrétion

La PVD donne sa couleur verte typique aux cultures de *P. aeruginosa* et appartient à une famille de sidérophores chromopeptidiques produits par les *Pseudomonas* fluorescents. La molécule se compose de trois parties : un chromophore dihydroxyquinoline conservé qui donne sa couleur verte à la molécule et la rend fluorescente, un peptide de longueur et de composition variable (6 à 12 acides aminés), et une chaîne latérale variable (Schalk *et al.*, 2020). Les souches de *P. aeruginosa* produisent quatre PVD (PVD de type I, II, III et IV) ayant des chaînes peptidiques différentes (Meyer, 2000) (Figure 14). Chaque souche de *P. aeruginosa* produit l'une de ces quatre PVD, la souche de référence PAO1 produit la PVD de type I (PVDI) (Meyer *et al.*, 1997).

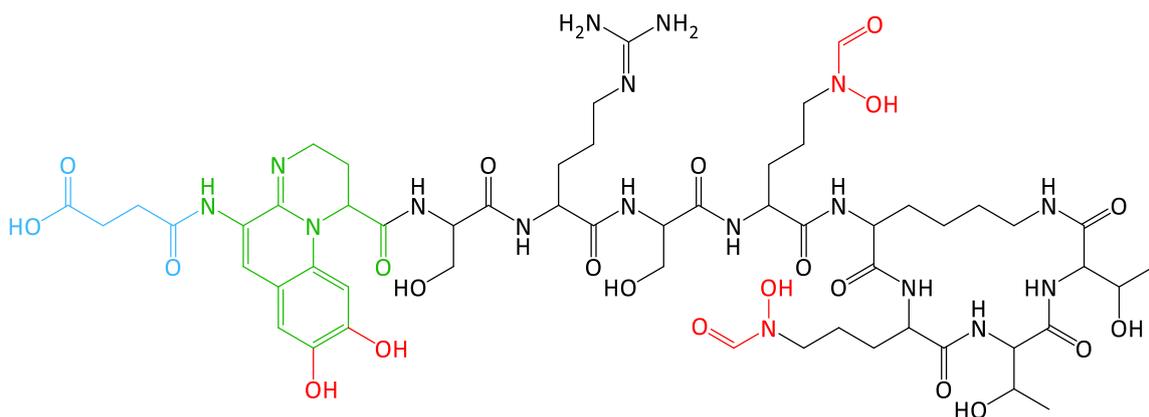


Figure 14 : Structure de la PVDI. Les fonctions chélatrices de fer sont représentées en rouge, le chromophore en vert, la chaîne latérale en bleu et la partie peptidique en noir.

Les PVD sont produites par synthèse peptidique non ribosomique (Schalk *et al.*, 2020; Visca *et al.*, 2007), cela signifie qu'il n'existe pas de code génétique pour leur synthèse, mais une série de gènes codant pour des enzymes qui synthétisent les PVD à partir d'acides aminés. La synthèse de PVDI a été principalement étudiée (Figure 15). L'assemblage de PVDI commence dans le cytoplasme bactérien avec la synthèse d'un précurseur peptidique de la PVDI ayant une chaîne grasse, et se termine dans le

périplasme avec la cyclisation d'une partie du peptide pour donner le chromophore. Le précurseur cytoplasmique de la PVDI est assemblé par quatre peptides synthétases non ribosomiques (*Non Ribosomal Peptide Synthetase*, NRPS) PvdL, PvdI, PvdJ, PvdD (Gasser *et al.*, 2015; Schalk and Guillon, 2013). PvdL lie un acide myristique ou myristoléique au premier acide aminé du peptide et assemble les 3 acides aminés qui vont former le chromophore de la PVDI. PvdDIJ additionne la suite des acides aminés de la chaîne peptidique. Ce précurseur de la PVDI contient des acides aminés atypiques qui sont synthétisés par les enzymes PvdH, PvdF et PvdA : la 2,4-diaminobutarate (synthétisée par PvdH) et la formylhydroxyornithine (synthétisée par PvdF et PvdA). Le précurseur de la PVDI assemblé dans le cytoplasme est exporté dans le périplasme par le transporteur ABC PvdE où sa maturation fait intervenir les enzymes PvdM, PvdN, PvdO, PvdP, PvdQ (Hannauer *et al.*, 2012; Yeterian *et al.*, 2010a). PvdQ clive la chaîne grasse, PvdP, PvdM et PvdO assurent la cyclisation oxydative donnant le chromophore et PvdN remanie la chaîne variable (Ringel and Brüser, 2018). PVDI est ensuite sécrétée par le système d'efflux PvdRT-OpmQ dépendant de l'ATP (Hannauer *et al.*, 2010b). La chaîne grasse permet probablement au précurseur de la PVDI de rester associé à la membrane cytoplasmique durant sa synthèse dans le cytoplasme (Hannauer *et al.*, 2012). Il est proposé également que toutes les NRPS impliquées dans l'assemblage de la PVDI interagissent dans le cytoplasme et forment un complexe enzymatique appelé le sidérosome au sein duquel la synthèse de la PVDI est réalisée (Gasser *et al.*, 2020, 2015; Guillon *et al.*, 2012; Imperi and Visca, 2013).

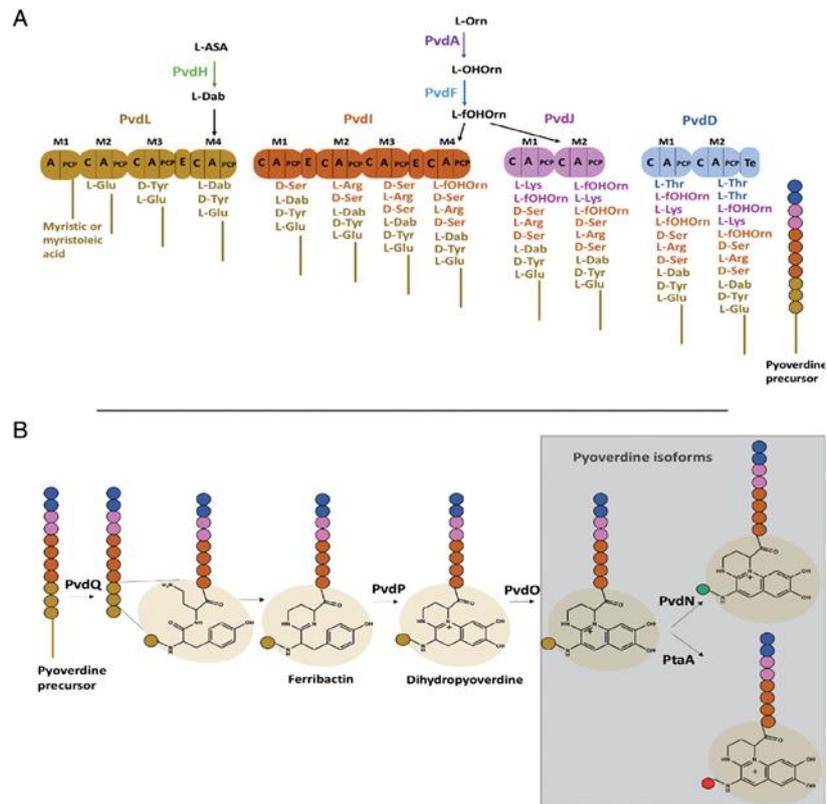


Figure 15 : Voies de biosynthèse de la PVDI chez *P. aeruginosa* PAO1 (Schalk *et al.*, 2020). A. Synthèse du précurseur de la PVDI dans le cytoplasme bactérien. Chacun des quatre NRPS (PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD) impliqués dans la synthèse est divisé en modules (M). Chaque module est composé d'un domaine de condensation (C), d'un domaine d'acétylation (A) et d'un domaine de protéine porteuse de peptides (PCP). PvdL et PvdI contiennent des domaines d'épimérisation (E) et PvdD un domaine de thioestérase (Te). Les acides aminés incorporés dans la chaîne sont indiqués sous chaque module, représentés par la couleur correspondante et par des cercles colorés dans le précurseur final. B. Maturation du précurseur en isoformes de PVDI dans le périplasm bactérien. Après la translocation du précurseur du cytoplasme vers le périplasm *via* PvdE, le précurseur subit un processus de maturation impliquant cinq enzymes (PvdQ, PvdP, PvdO, PvdN et PtaA). Les cercles verts et rouges sur les isoformes de PVDI représentent respectivement l'acide succinique et l'acide α -cétoglutarique.

1.1.2 Import du complexe PVDI-Fe et régulation de la voie

La PVDI chélate l'ion Fe^{3+} par le groupement catéchol du chromophore et par les deux fonctions hydroxamates de la séquence peptidique, avec une stœchiométrie 1:1. La PVDI est un ligand hexadentate avec une forte affinité pour le fer ferrique, sa constante d'association est de $10^{30,8} \text{ M}^{-1}$ (Albrecht-Gary *et al.*, 1994). Le complexe de la PVDI avec le fer (PVDI-Fe) formé dans l'environnement de la bactérie est transporté à travers la membrane externe par son TBDT spécifique FpvA (Poole *et al.*, 1993) (Figure 16) ou par un autre transporteur à plus large spectre, FpvB (Ghysels *et al.*, 2004) (Figure 17). Le complexe PVDI-Fe va interagir avec le site de liaison de FpvA, le chromophore se lie avec le domaine bouchon tandis que la partie peptidique interagit avec le tonneau β (Greenwald *et al.*, 2009; Nader *et al.*, 2007). Le TBDT FpvA de *P. aeruginosa* PAO1 est capable de reconnaître certaines

PVD produites par d'autres espèces de *Pseudomonas* et de transporter des PVD des types produits par d'autres souches de *Pseudomonas* (Greenwald *et al.*, 2009; Hohnadel and Meyer, 1988; Meyer, 2000).

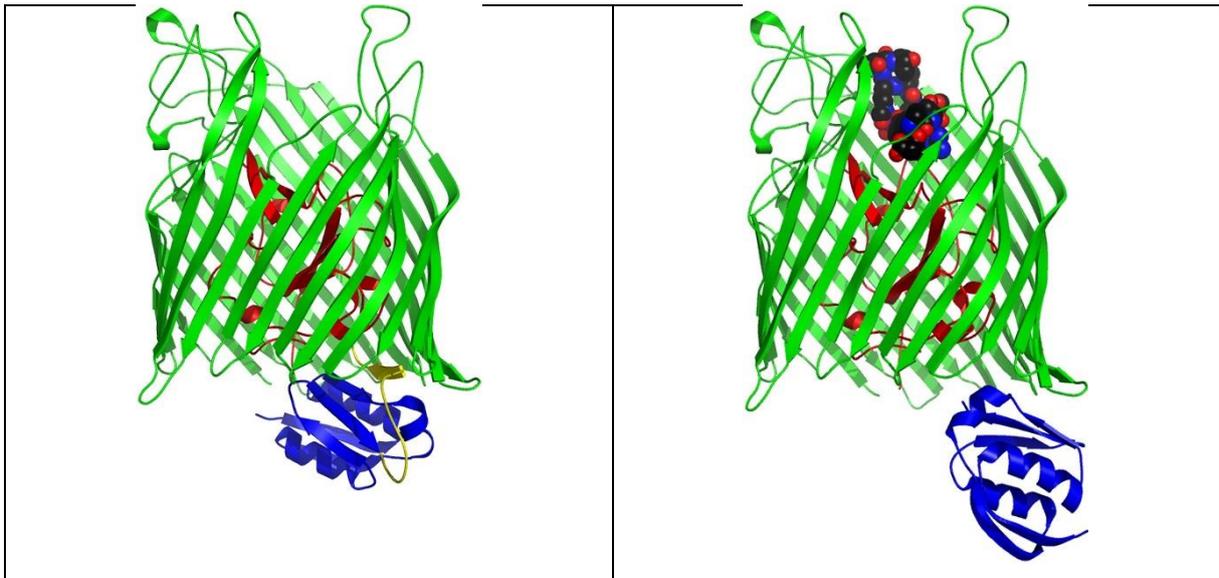


Figure 16 : Structure aux rayons X de FpvA, le TBDT du complexe PVDI-Fe (Brillet *et al.*, 2007). Sur les deux structures, le bouchon est en rouge et le tonneau en vert. Le domaine de signalisation, en bleu, peut interagir avec le facteur anti- σ FpvR. La boucle reliant le domaine de signalisation au domaine bouchon est colorée en jaune et correspond à la TonB box. À gauche, FpvA seul. À droite, une molécule de PVDI-Fe est liée à FpvA et le domaine de signalisation s'est déplacé pour permettre l'interaction avec FpvR et avec TonB pour la TnB box.

Dans le périplasme, le complexe PVDI-Fe se lie aux protéines périplasmiques FpvF et FpvC, puis le fer ferrique est réduit en fer ferreux par la réductase de la membrane interne FpvG (Brillet *et al.*, 2012). L'activité de FpvG est optimum en présence des deux protéines de la membrane interne FpvH et FpvK et de la protéine périplasmique FpvJ (Ganne *et al.*, 2017). Les fonctions exactes de FpvH, FpvK et FpvJ ne sont pas connues. Des expériences de double hybride et de pull-down ont montré que toutes ces protéines interagissent et forment probablement un complexe protéique FpvC-FpvF-FpvG-FpvH-FpvJ au sein duquel la réduction du fer et la dissociation de la PVDI avec le fer se déroule (Bonneau *et al.*, 2020). L'apo-PVDI interagit ensuite avec FpvF qui amène le sidérophore à la pompe à efflux PvdRT-OpmQ pour être recyclée dans le milieu extracellulaire (Bonneau *et al.*, 2020; Schalk *et al.*, 2002; Yeterian *et al.*, 2010b) et l'ion Fe^{2+} est chélaté par FpvC, qui l'amène au transporteur ABC FpvDE pour être importé dans le cytoplasme (Brillet *et al.*, 2012). La structure de FpvC en complexe avec le fer ferreux a été résolue, révélant un site hexahistidine ayant la capacité de stabiliser le Fe^{2+} (Vigouroux *et al.*, 2020). Cette protéine périplasmique est capable de lier le fer ferreux après la dissociation du complexe sidérophore-Fe pour ensuite l'amener vers le transporteur ABC FpvDE (Ganne *et al.*, 2017).

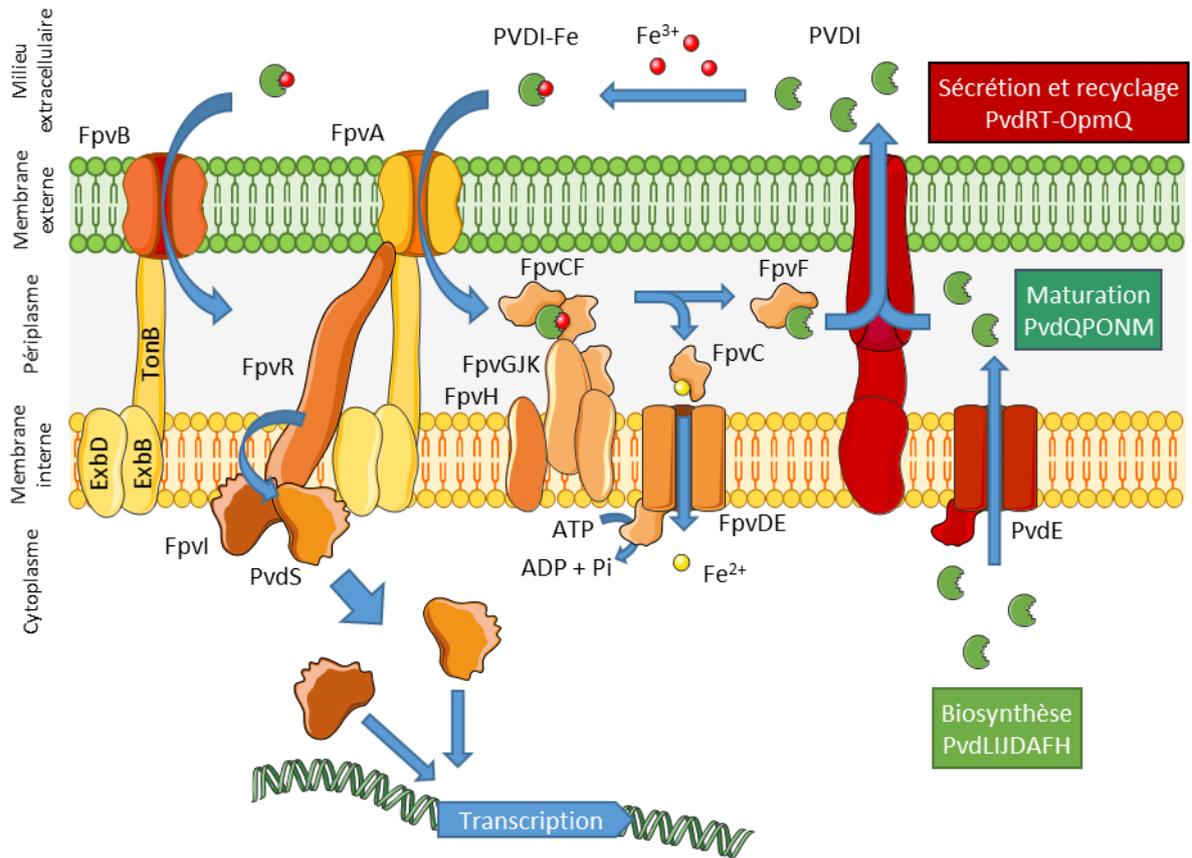


Figure 17 : Voie d'acquisition du complexe PVDI-Fe.

La régulation positive de l'expression des gènes impliqués dans la voie d'acquisition de PVDI est orchestrée par le facteur anti- σ FpvR et les facteurs σ FpvI et PvdS (Rédly and Poole, 2003) (Figure 18). FpvI régule la transcription de *fvpA* alors que PvdS régule la transcription de tous les autres gènes impliqués dans la biosynthèse et l'import du fer par la PVDI (Rédly and Poole, 2003). Aucun système de régulation de l'expression de *fvpB* n'a été identifié.

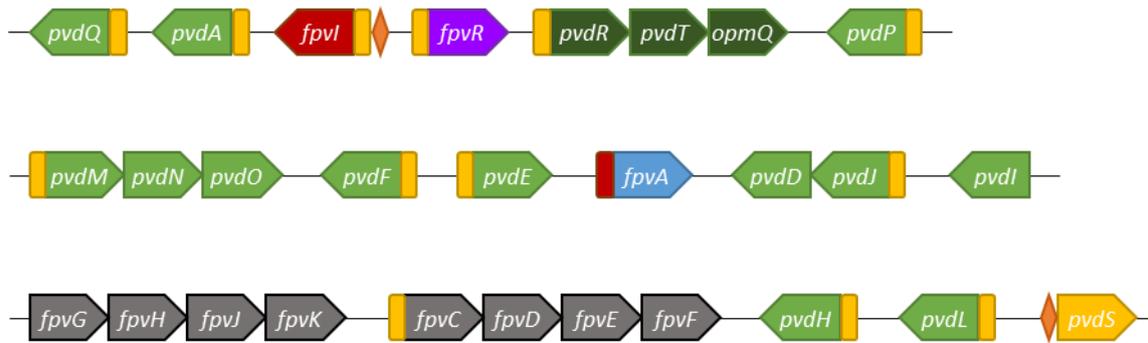


Figure 18 : Organisation des gènes des voies de biosynthèse et d'acquisition de la PVDI chez PAO1. Les gènes impliqués dans la biosynthèse sont en vert, les gènes impliqués dans la sécrétion de PVDI sont en vert foncé, le gène codant pour le TBDT FpvA est en bleu, le gène codant pour le facteur anti- σ FpvR est en violet, le gène codant pour le facteur σ Fpvi est en rouge et le promoteur avec lequel il interagit est représenté par un rectangle rouge en amont du gène dont l'expression est contrôlée, le gène codant pour le facteur σ PvdS est en jaune et les promoteurs avec lesquels il interagit sont représentés par un rectangle jaune en amont des gènes ou opérons dont l'expression est contrôlée, les autres gènes de la voie d'acquisition sont en gris, les Fur-box sont représentées par un losange orange. Les gènes représentés en contact direct sont regroupés dans le même opéron.

1.2 Voie de la PCH

1.2.1 Biosynthèse et sécrétion

La structure de la PCH, le second sidérophore produit par *P. aeruginosa* PAO1, repose sur une structure chimique de type 2-hydroxyphénylthiazoliny-thiazolidine (Figure 19). La PCH est issue de la biosynthèse et de la condensation de deux cystéines et d'un acide salicylique. Elle implique les opérons *pchDBCA* et *pchEFGHI* (Reimann *et al.*, 1998). Les enzymes PchA, PchB et PchD synthétisent le salicylate à partir de chrosimate (Gaille *et al.*, 2003; Meneely *et al.*, 2013; Serino *et al.*, 1997), puis PchE et PchF, deux NRPS, vont intégrer les cystéines grâce aux enzymes PchC et PchG (Reimann *et al.*, 2004, 2001; Ronnebaum *et al.*, 2019). Cette voie de synthèse est entièrement cytoplasmique, elle n'implique aucune maturation périplasmique (Ronnebaum and Lamb, 2018). Il a été également proposé que ces enzymes impliqués dans la synthèse de la PCH s'organisent en sidérosome et que la synthèse du complexe se fait au sein de ce complexe protéique (Cunrath *et al.*, 2015). La manière dont la PCH est sécrétée dans le milieu extracellulaire reste inconnue.

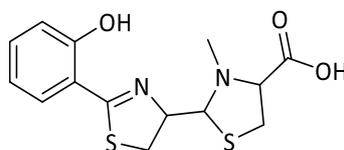


Figure 19 : Structure de la PCH.

1.2.2 Import du complexe PCH-Fe et régulation de la voie

La PCH chélate le fer avec une affinité plus faible que la PVDI, sa constante d'association est de $10^{28,8} \text{ M}^{-2}$, et avec une stœchiométrie de 2:1 (PCH:Fe³⁺) (Brandel *et al.*, 2012). Ce ligand tétradentate chélate l'ion ferrique grâce à deux amines et deux alcools. La PCH chargée en fer (PCH-Fe) est importée au travers la membrane externe par le TBDT FptA (Ankenbauer and Quan, 1994) (Figure 20). La reconnaissance du complexe PCH-Fe par FptA nécessite la présence que d'une seule molécule de PCH, sachant que deux molécules de PCH sont nécessaires pour chélater le fer. Les deux autres sites de coordination de l'ion ferrique pouvant être occupés par un ligand bidentate autre que la PCH.

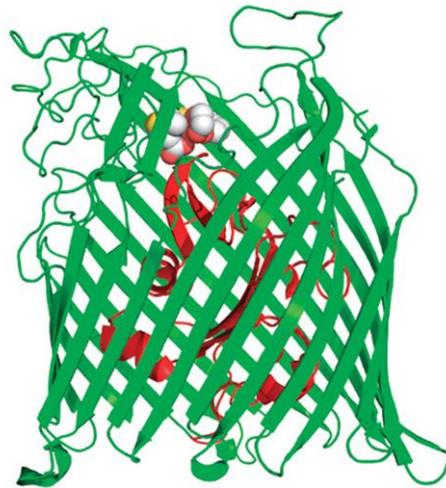


Figure 20 : Structure aux rayons X de FptA lié au complexe PCH-Fe (Brillet *et al.*, 2011). Le bouchon et les tonneaux β transmembranaires sont colorés en rouge et en vert respectivement. Le complexe PCH-Fe est fixé au site de liaison sur le bouchon.

Une fois dans le périplasma, une fraction du complexe PCH-Fe traverse la membrane interne par la perméase FptX et l'énergie nécessaire est fourni par la force protomotrice de la membrane interne (Cunrath *et al.*, 2015) (Figure 21) pour ensuite se lier au régulateur transcriptionnel PchR, induisant l'expression de tous les gènes codant pour des protéines de la voie PCH (Michel *et al.*, 2005) (Figure 22).

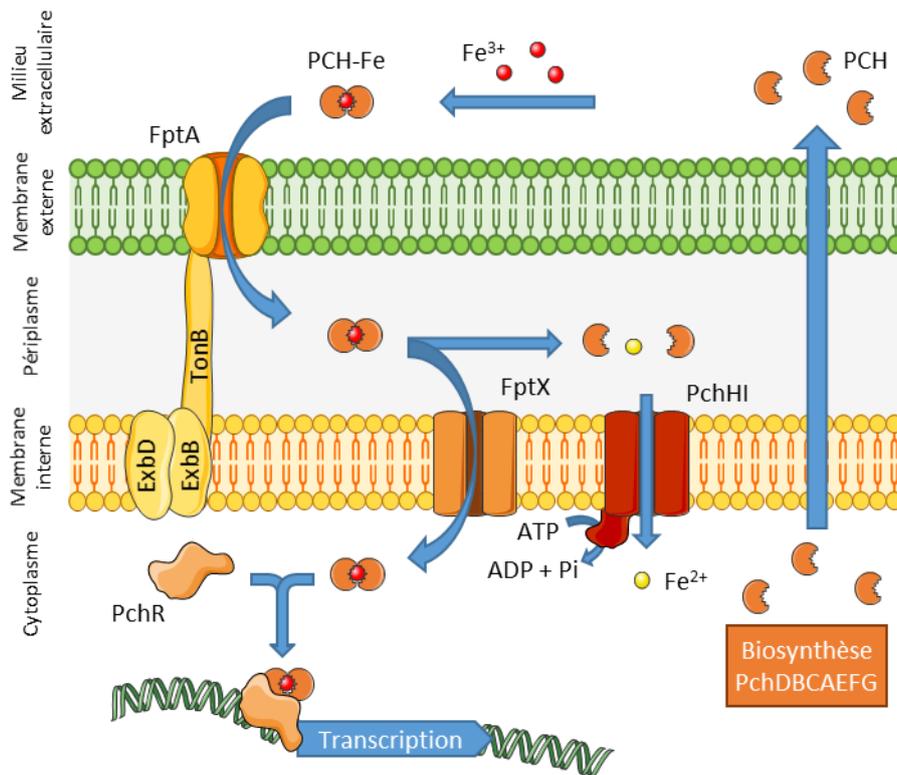


Figure 21 : Voie d'acquisition du complexe PCH-Fe.

Ce régulateur n'a cependant pas nécessairement besoin d'être activé par sa liaison avec le complexe PCH-Fe pour activer la transcription des gènes de la voie PCH (Cunrath *et al.*, 2020). Il a été proposé que pour l'essentiel des complexes PCH-Fe, le fer est libéré du sidérophore dans le périplasme avec le fer libre qui est transporté ensuite par le transporteur ABC PchHI (Roche *et al.*, 2021). Le mécanisme impliqué dans cette dissociation reste encore non élucidé.

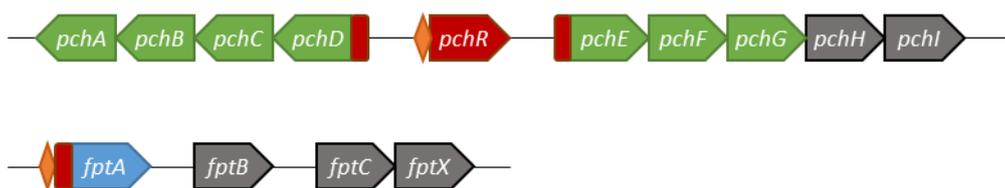


Figure 22 : Organisation des gènes des voies de biosynthèse et d'acquisition du fer par la PCH chez PAO1. Les gènes impliqués dans la biosynthèse sont en vert, le gène codant pour le TBDT FptA est en bleu, le gène codant pour le régulateur PchR est en rouge et les promoteurs avec lesquels il interagit sont représentés par un rectangle rouge en amont des gènes ou opérons dont l'expression est contrôlée, les autres gènes de la voie d'acquisition sont en gris, les Fur-box sont représentées par un losange orange. Les gènes représentés en contact direct sont regroupés dans le même opéron.

La capacité de *P. aeruginosa* à excréter deux sidérophores, l'un avec une forte affinité pour le fer et le second avec une affinité plus faible, permet à la bactérie de s'adapter à différents environnements. En effet, la PVDI est produite dans des conditions de forte carence en fer et la PCH dans des conditions où la carence en fer est moins sévère (Cunrath *et al.*, 2015). De plus, la PCH est souvent produite en première au cours de la croissance bactérienne et lorsque le fer devient plus limité, la production de la PVDI est activée (Dumas *et al.*, 2013). Cela suggère que la PCH n'est pas redondante de la PVDI, mais que l'utilisation spécifique de l'un ou l'autre de ces deux sidérophores pourrait être bénéfique pour *P. aeruginosa*. La PVDI est non seulement plus efficace pour chélater le fer, mais aussi plus coûteuse à produire. La capacité de produire une alternative moins coûteuse pourrait permettre aux bactéries de minimiser les coûts et d'optimiser l'efficacité de ses sidérophores dans un environnement où la concentration en fer est fluctuante (Dumas *et al.*, 2013).

2 Voies d'acquisition du fer impliquant des sidérophores exogènes

P. aeruginosa peut également utiliser de nombreux sidérophores produits et sécrétés par d'autres micro-organismes, aussi appelés sidérophores exogènes ou exosidérophores (Perraud *et al.*, 2020b; Schalk and Perraud, 2023). La capacité à utiliser ces différents sidérophores va de pair avec l'expression dans les cellules de *P. aeruginosa* de systèmes d'importation du fer spécifiques pour chacun de ces sidérophores.

2.1 Voies des catéchols

2.1.1 Tri- et bicatéchols

2.1.1.1 L'entérobactine

L'entérobactine (ENT) est l'archétypique des sidérophores tricatécholés présentant une affinité exceptionnellement élevée pour le Fe^{3+} ($K_a = 10^{49} \text{ M}^{-1}$) (Loomis and Raymond, 1991). De nombreuses bactéries Gram négatives, dont *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium et *Klebsiella pneumoniae*, produisent et utilisent ce sidérophore. L'ENT comprend trois groupements catécholamines reliés par un anneau trilactone (Figure 23) et, lorsqu'elle n'est pas liée au fer, est rapidement dégradée. Le Fe^{3+} est coordonné de manière octaédrique par les six hydroxyles des trois catéchols déprotonés à pH neutre. Chez *E. coli*, le complexe entérobactine-Fe (ENT-Fe) est reconnu à la surface cellulaire et transporté dans le périplasme par FepA, TBDT spécifique de l'ENT. *P. aeruginosa*

ne produit pas d'ENT mais possède dans son génome un gène codant pour le TBDT PfeA, apparenté à FepA, qui lie le complexe ENT-Fe et l'importe dans le périplasme.

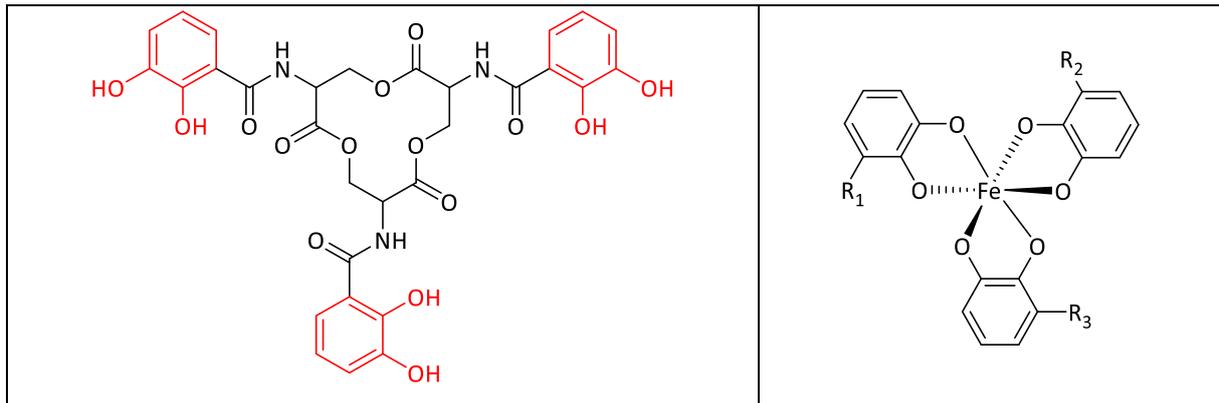


Figure 23 : Structure de l'ENT. Les fonctions catéchols sont représentées en rouge. La structure de la chélation d'un ion ferrique par trois groupements catéchols est présentée à droite.

La structure cristalline de ENT-Fe lié à PfeA a révélé les détails moléculaires de la reconnaissance du complexe ferrique par son transport (Figure 24) (Moynié *et al.*, 2019). L'ENT-Fe est d'abord reconnu par les hélices α des boucles extracellulaires de PfeA, ce qui induit un changement de conformation des boucles et des régions N-terminales du domaine bouchon (NL1 et NL3). Le complexe sidérophore-Fe peut alors se déplacer vers le site de liaison secondaire situé au niveau du domaine bouchon. Suite au changement de conformation de la région N-terminale, la TonB-box interagit avec TonB, ce qui entraîne un réarrangement du domaine bouchon, permettant le transport de ENT-Fe dans le périplasme.

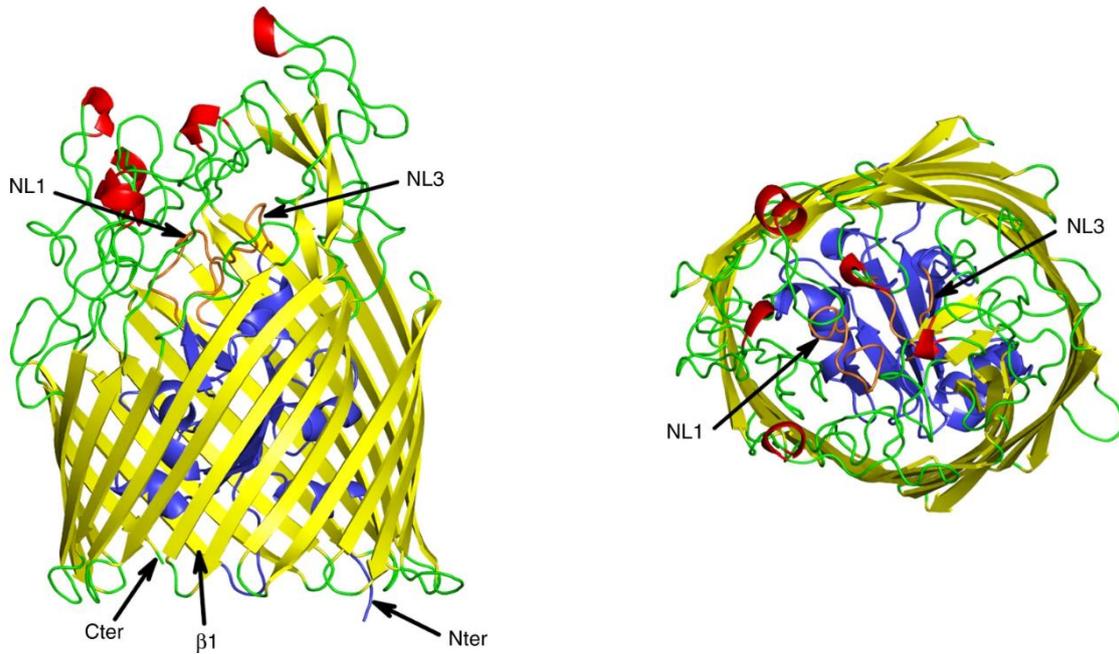


Figure 24 : Structure aux rayons X de PfeA (Moynié *et al.*, 2019). Le tonneau β est coloré en jaune, les boucles extracellulaires en vert, les hélices α dans les boucles du tonneau en rouge, le domaine bouchon N-terminal en bleu et les boucles NL1 et NL3 du domaine bouchon en orange.

Dans le périplasme, l'anneau trilactone est hydrolysé par l'estérase PfeE sans que cela entraîne une libération du fer du sidérophore. Le fer reste associé aux trois molécules de 2,3-dihydroxybenzoïlsérine (DHBS) formant le complexe (DHBS)₃-Fe (Gasser *et al.*, 2021; Perraud *et al.*, 2018). La libération du fer de ce complexe nécessite une réduction du fer par une réductase encore non identifiée. La façon dont le fer est ensuite transporté à travers la membrane interne dans le cytoplasme reste inconnue. L'expression de *pfeA* et *pfeE* est régulée par le système à deux composants PfeS/PfeR, où PfeS est le senseur de la membrane interne et PfeR le régulateur transcriptionnel. Le mécanisme implique une liaison de ENT-Fe au senseur PfeS dans le périplasme bactérien, qui ensuite libère PfeR. Les sites de liaison de PfeR sur la région promotrice de *pfeA* sont caractérisés par deux paires de séquences répétitives (Figure 25) (Dean *et al.*, 1996).

```

1 CCTCCCCTACCAGCGCCTGGACGATAGCGCCGGCGAAGGTTTCGGCCTCG      50
                                     A1
51 GCCTGGCGATCGCCCGGCGCGCCATCGAGCTACAGGGCGGCCGGCTCTGG      100
                                     B1                                     A2
101 GCCAGCAACGGCAAGGCCCGGAATTGTGCCTGCACCTGTGGCTGCCGGCGGC      150
151 CGCCTGAGGGCGAAGTGTTTAGAAAGTTAATGCGCTTTACTCTCAAATAA      200
    Fur box                                     B2
201 CAATCAATATCATTTGTGATCTCTTGCATTCGCTGCATTGCCCGGGAT      250

251 CACCGATG → pfeA

```

Figure 25 : Région promotrice de *pfeA*. Sont indiqués : le site de départ de la transcription de *pfeA* (en gras et souligné), la Fur box et les deux paires de séquences répétitives A1-A2 et B1-B2, sites de liaison de PfeR (en gras, souligné et en italique).

Un autre TBDT présent dans le génome de *P. aeruginosa*, PirA, est capable également de transporter ENT-Fe à travers la membrane externe en l'absence de PfeA (Figure 26). Probablement dans ce scénario, la dissociation du fer de l'ENT implique également l'estérase PfeE.

La transcription de *pirA* implique le système à deux composantes PirR/PirS, qui est similaire à PfeR/PfeS (Ghysels *et al.*, 2005). Cependant, même si le complexe ENT-Fe peut être importé à travers la membrane externe par PirA, il n'est pas en mesure d'activer efficacement le système à deux composantes PirS/PirR pour induire l'expression de *pirA* (Gasser *et al.*, 2021). Aucun gène codant pour une réductase, une enzyme capable de modifier les sidérophores ou un transporteur de la membrane interne, n'a été trouvé à côté des locus de *pirA*, *pirR* et *pirS*.

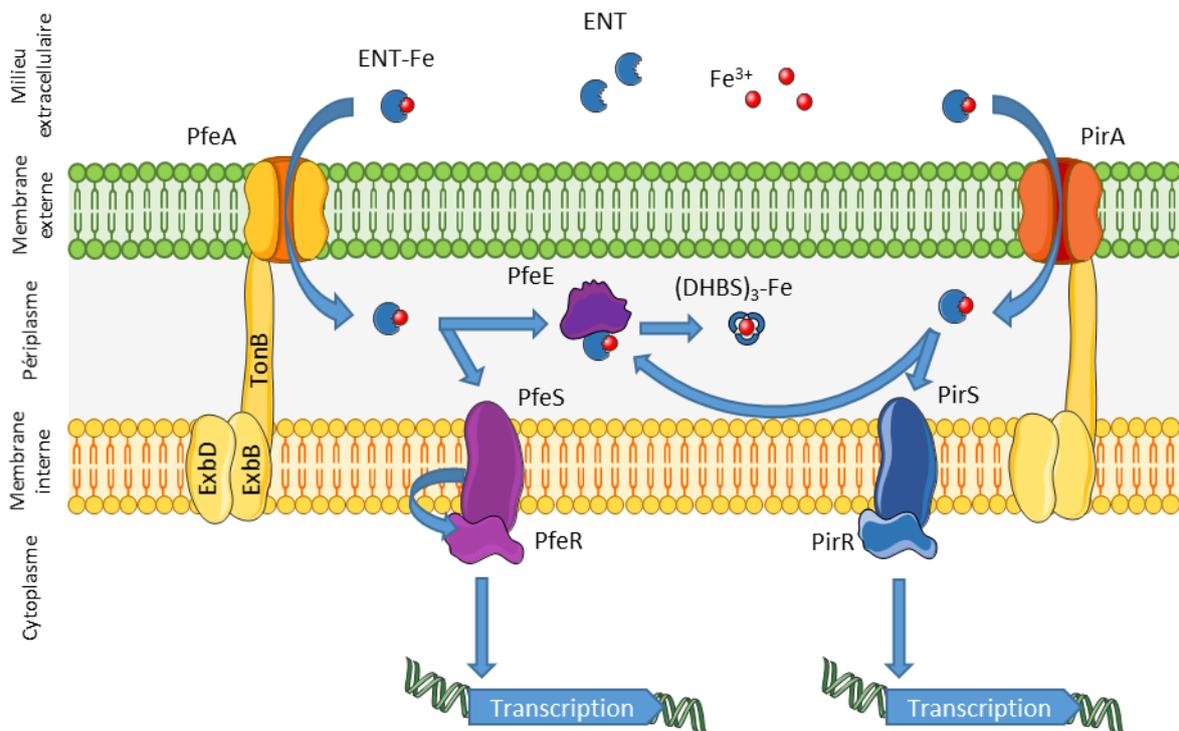


Figure 26 : Voie d'acquisition du complexe ENT-Fe.

Parallèlement à l'induction de l'expression de la voie d'acquisition impliquant le TBDT PfeA, la présence de complexes ENT-Fe dans le milieu de *P. aeruginosa* entraîne une répression de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la PCH ainsi que les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'import du fer par ce sidérophore (Gasser *et al.*, 2016; Perraud *et al.*, 2018). Cependant, aucun effet sur l'expression des gènes du locus de la PVD n'a été observé (Gasser *et al.*, 2016; Perraud *et al.*, 2018). *P. aeruginosa* utilise donc préférentiellement un sidérophore exogène à fort pouvoir chélateur pour promouvoir l'absorption du fer, au détriment de son système qui utilise la PCH, ayant une affinité pour le fer plus faible. L'expression des protéines impliquées dans l'import du fer par la PVDI n'est pas modifiée.

Les gènes codants pour les protéines décrites de la voie des catéchols *pfe/pir* sont regroupés par locus dans le génome de *P. aeruginosa* et à chaque fois divisés en deux opérons différents, l'un contenant *pfeA* et *pfeE* et le second *pfeR* et *pfeS* pour le locus *pfe*, *pirA* d'un côté et *pirR* et *pirS* de l'autre pour le locus *pir* (Figure 27). Ces quatre opérons sont régulés par Fur, un site de liaison à cette protéine se trouve à chaque fois en amont (Dean *et al.*, 1996; Charles R. Dean and Poole, 1993).

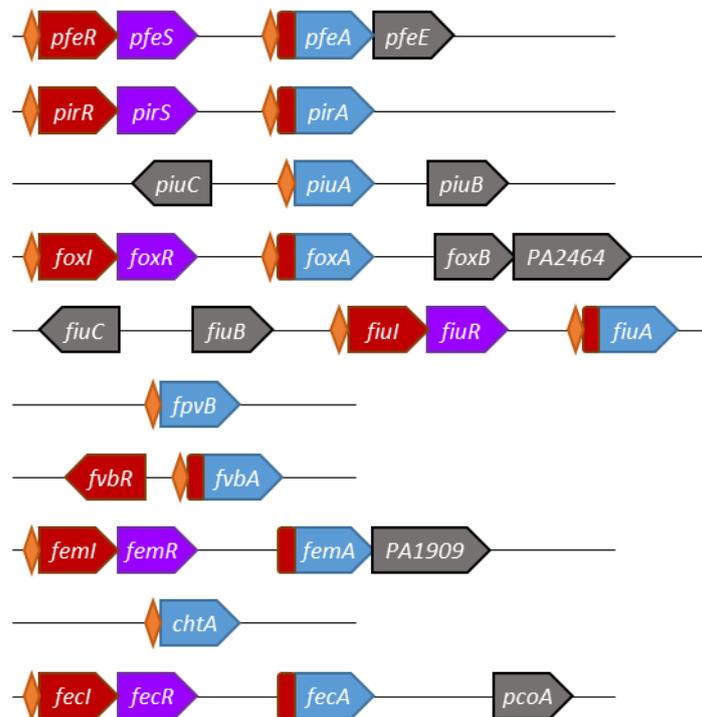


Figure 27 : Organisation des gènes des voies d'acquisition des exosidérophores chez PAO1. Pour chaque voie, le gène codant pour le TBDT est en bleu, le gène codant pour le régulateur est en rouge et le promoteur avec lequel il interagit est représenté par un rectangle rouge en amont du gène ou de l'opéron dont l'expression est contrôlée, le gène codant pour une autre protéine impliquée dans la régulation est en violet, les autres gènes de la voie d'acquisition du fer sont en gris, les Fur-box sont représentées par un losange orange. Les gènes représentés en contact direct sont regroupés dans le même opéron.

2.1.1.2 La protochéline, l'azotochéline et la salmochéline S4

Deux autres sidérophores avec des groupements catéchols, la protochéline (PROTO) et l'azotochéline (AZOTO) (Figure 28), tous deux produits par *Azotobacter vinelandii*, peuvent également être utilisés comme exosidérophores par *P. aeruginosa* (Gasser *et al.*, 2016). La PROTO est un ligand hexadenté, similaire à l'ENT, alors que l'AZOTO est un ligand tétradenté, avec seulement deux fonctions catéchol. Lorsque *P. aeruginosa* est cultivée en présence de ces composés catécholés, le même schéma de régulation que pour l'ENT est retrouvé : l'expression du TBDT PfeA et de l'estérase PfeE est fortement activée et l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans la voie endogène d'absorption du fer PCH est réprimée (Gasser *et al.*, 2016). Ces deux sidérophores chélatés au Fe sont importés par le même système que celui de l'ENT-Fe. Les structures de PfeA en complexe avec les composés azotochéline-Fe (AZOTO-Fe) et protochéline-Fe (PROTO-Fe) ont été résolues et ont montré que, bien que l'AZOTO et la PROTO sont chimiquement différents de l'ENT, ils sont reconnus par les mêmes types d'interactions par PfeA (Moynié *et al.*, 2019). La structure du complexe PfeA-AZOTO-Fe fait intervenir une autre molécule comme un monocatéchol, une molécule de citrate ou de

céprobactine par exemple, pour compléter la sphère de coordination de fer et former un complexe octaédrique (Moynié *et al.*, 2019).

La salmochéline S4 (SALMO) est un sidérophore tricatécholé produit par des bactéries telles que *Salmonella enterica* (Müller *et al.*, 2009). Cette molécule est un dérivé de l'ENT : la SALMO est une ENT avec des catéchols C-glucosylés. D'après des données non publiées du laboratoire, ce sidérophore semble pouvoir être utilisé par *P. aeruginosa*, mais la voie par laquelle il est importé reste encore à être élucidée (Figure 28).

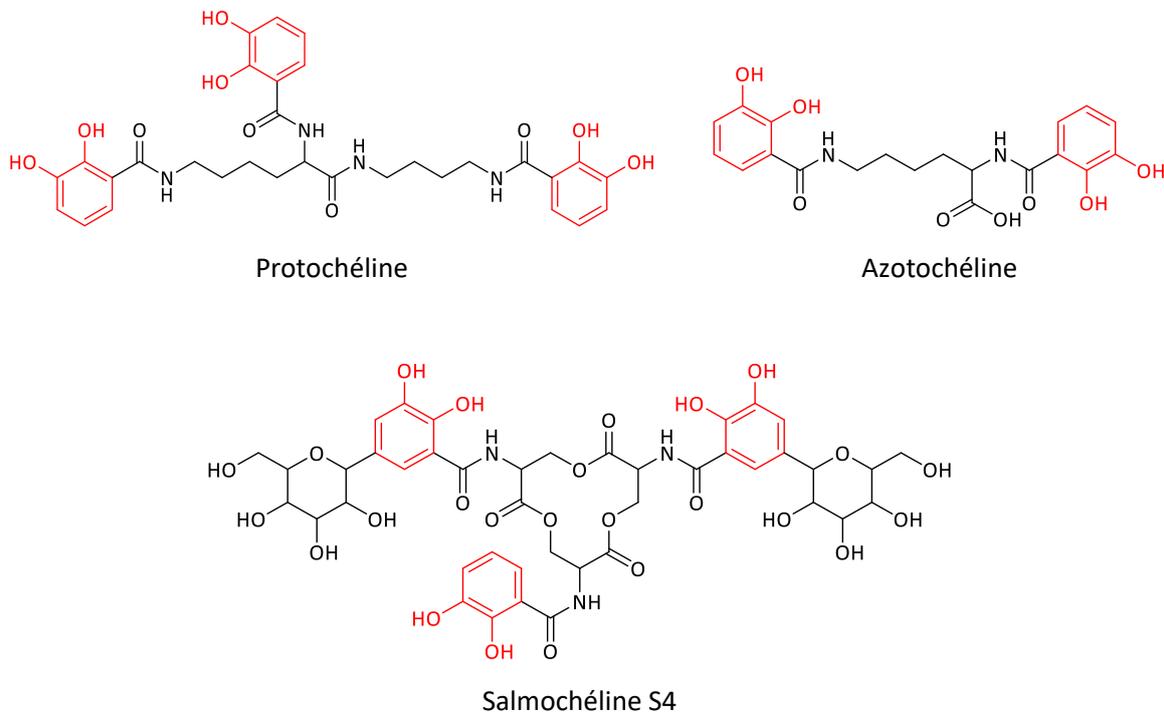


Figure 28 : Structures de sidérophores tri- et bicatéchols. Les fonctions catéchols sont représentées en rouge.

2.1.2 Monocatéchols

Il a été montré récemment que les neurotransmetteurs de type catécholamine tels que la dopamine, la L-DOPA, l'épinéphrine et la norépinéphrine sont capables de chélater le fer et de le transporter efficacement dans les cellules de *P. aeruginosa* par l'intermédiaire des TBDT PiuA et PirA (Figure 29 et 30) (Perraud *et al.*, 2022). Ces monocatéchols complexent vraisemblablement le fer avec une stœchiométrie 3 :1 ou en étant en complexe avec d'autres molécules chélatrices. Il est peu probable que les catécholamines entrent en compétition pour le fer avec les sidérophores endogènes de *P. aeruginosa* du fait de leur faible affinité pour le fer. Cependant, cela n'exclut pas un rôle biologique important pour ces molécules, en particulier lors d'infections chroniques. *P. aeruginosa* est également

capable d'utiliser des phénols d'origine végétale contenant un groupement catéchol pour accéder au fer tels que l'acide caféique, l'acide chlorogénique, la quercétine ou la lutéoline (Figure 29 et 30) (Luscher *et al.*, 2022).

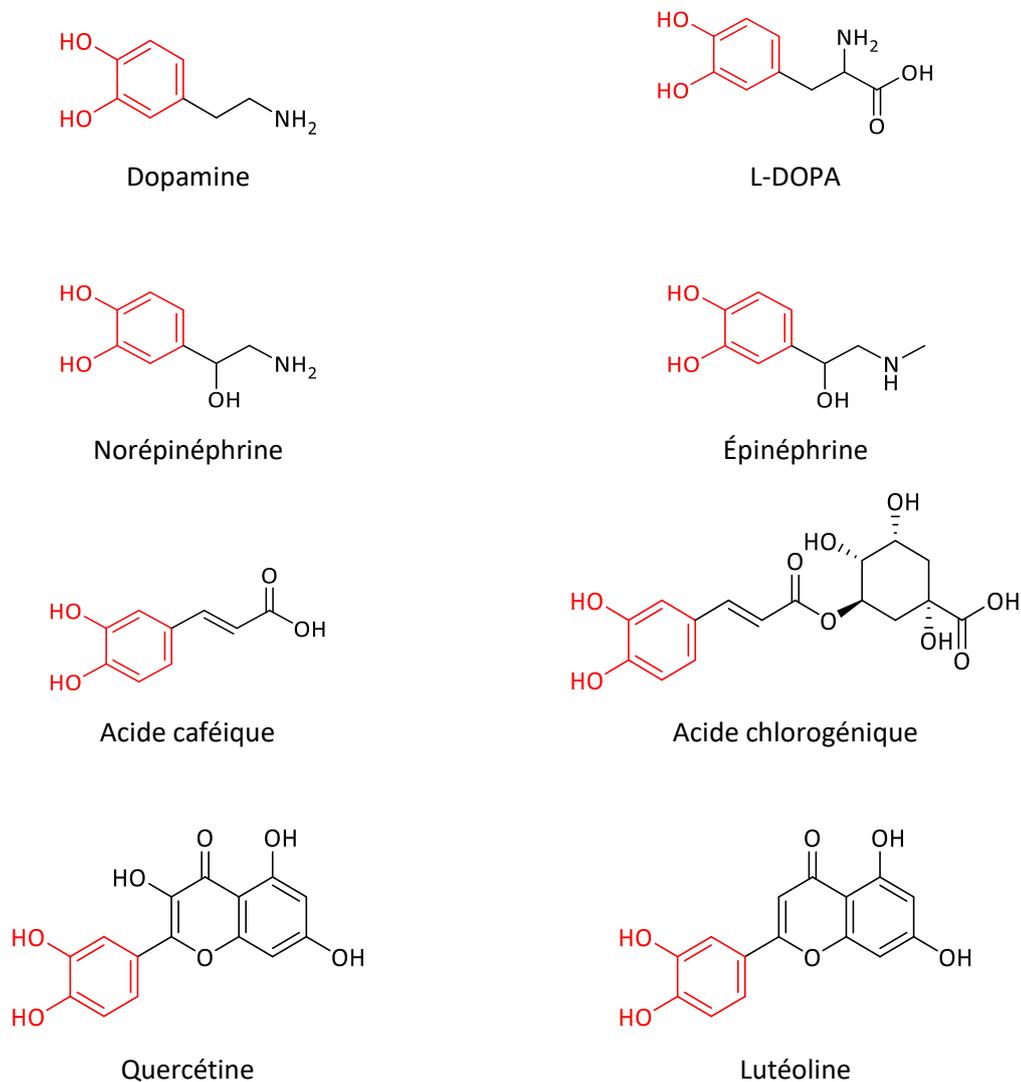


Figure 29 : Structures de monocatéchols chélateurs de fer et pouvant être utilisés comme des sidérophores par *P. aeruginosa*. Les fonctions catéchols sont représentées en rouge.

Les TBDT impliqués sont également PiuA ou PirA. Ces deux voies d'acquisition sont liées par une interaction transcriptionnelle : la transcription de *pirA* est régulée par le système à deux composantes PirS/PirR et PirR est capable d'induire aussi la transcription de *piuA* (Luscher *et al.*, 2022). Mis à part Fur et l'interaction avec PirR, aucun système de régulation pour l'expression de la voie d'acquisition impliquant le TBDT PiuA n'est connu. Les complexes ferriques des mono-catéchols décrits pourraient

induire l'expression de ces systèmes par liaison avec PirS. Le locus *piu* est organisé en deux opérons *piuA/piuB* et *piuC/piuD* (Figure 27). Les gènes *piuBC* coderaient pour une perméase de la membrane interne à laquelle PiuA se lierait directement pour permettre le transport du complexe ferrique jusqu'au cytoplasme (Yifan Zhang *et al.*, 2020). La fonction et la localisation de la protéine codée par *piuD* sont inconnues.

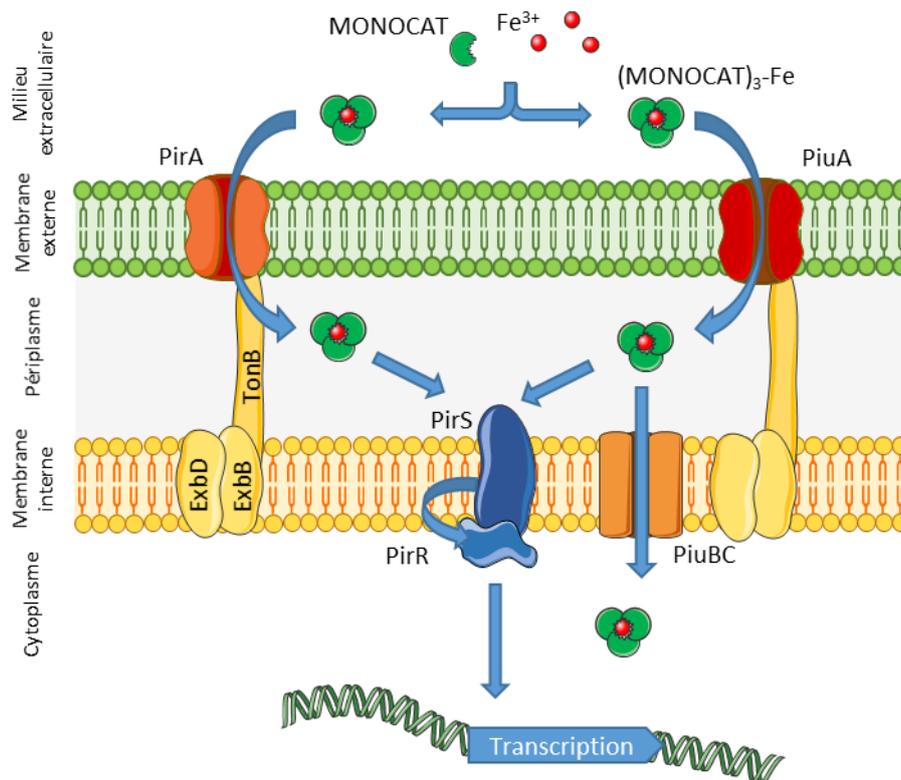


Figure 30 : Voie d'acquisition des complexes monocatéchols-fer (dopamine, L-DOPA, épinéphrine, norépinéphrine, acide caféique, acide chlorogénique, quercétine, lutéoline). MONOCAT : monocatéchol libre, (MONOCAT)₃-Fe : complexe de trois monocatéchols avec du fer.

2.2 Voie des Hydroxamates

Dans certaines niches écologiques, *P. aeruginosa* peut se retrouver en compétition avec des mycètes ou des bactéries du genre *Streptomyces*, dont certains possèdent également des systèmes d'acquisition du fer utilisant des sidérophores. Ces sidérophores sont généralement composés par des groupements chélateurs de type hydroxamate.

2.2.1 La nocardamine

Les desferrioxamines représentent une famille variée de sidérophores chélatant le fer à l'aide de fonctions hydroxamates. La desferrioxamine E, aussi appelée nocardamine (NOCA), est un sidérophore

tris-hydroxamate cyclique (Figure 31) qui est synthétisé par divers actinomycètes, tels que *Nocardia* et *Micromonospora* (Zähner *et al.*, 1962), et par des bactéries, telles que *Streptomyces griseus* (Yamanaka *et al.*, 2005). Son affinité pour le fer est similaire à celle de la PVDI ($K_a = 10^{32} \text{ M}^{-1}$) (Anderegg *et al.*, 1963) avec une stœchiométrie pour la chélation de 1:1.

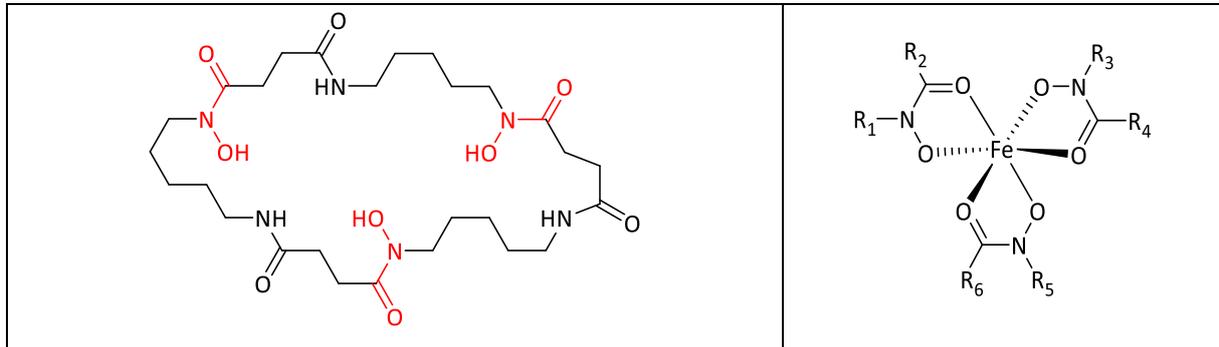


Figure 31 : Structure de la NOCA. Les fonctions hydroxamates sont représentées en rouge. La structure de la chélation d'un ion ferrique par trois groupements hydroxamates est présentée à droite.

Le complexe nocardamine-Fe (NOCA-Fe) est importé dans *P. aeruginosa* par FoxA (Normant *et al.*, 2020). La structure aux rayons X de FoxA, en interaction avec le complexe NOCA-Fe, a été résolue (Figure 32). Le site de liaison du complexe NOCA-Fe se trouve comme pour tous les TBDT sur le bouchon sur la face extracellulaire du transporteur. La liaison de NOCA-Fe à son site de liaison sur FoxA initierait une cascade de réarrangements structuraux dans le domaine du bouchon. Ces réarrangements de FoxA déclenchent l'exposition du motif TonB-box pour permettre l'interaction avec TonB, entraînant la formation d'un canal pour permettre le passage du substrat à travers la lumière du tonneau (Josts *et al.*, 2019). La dissociation du fer de la NOCA implique la réductase FoxB, homologue de FpvG (réductase de la voie d'import du fer par la PVDI). La structure aux rayons X de FoxB montre un dimère avec un domaine transmembranaire en hélice α abritant deux molécules d'hèmes, certainement impliqués dans le transfert d'électrons lors de la réduction du fer (Josts *et al.*, 2021). Cette dissociation du fer de la NOCA se déroule certainement dans le périplasma de la bactérie comme pour la voie PVDI. La molécule chélatrice du fer ferreux n'a pas été identifiée pour le moment, ainsi que le transporteur du fer au travers de la membrane interne.

La liaison de NOCA-Fe à FoxA entraîne également un mouvement du domaine de signalisation pour permettre une interaction avec le facteur anti- σ FoxR. Cette interaction initie un clivage protéolytique de FoxR dans le périplasma, qui entraîne la libération du facteur σ FoxI dans le cytoplasme. Ce dernier va diriger la RNA polymérase vers le promoteur de *foxA* (Figure 33) (Chan *et al.*, 2022; Llamas *et al.*, 2006). Les séquences I1 et I2 de la région promotrice de *foxA* correspondent aux sites de liaison où FoxI se fixe pour déclencher la transcription (Enz *et al.*, 2003).

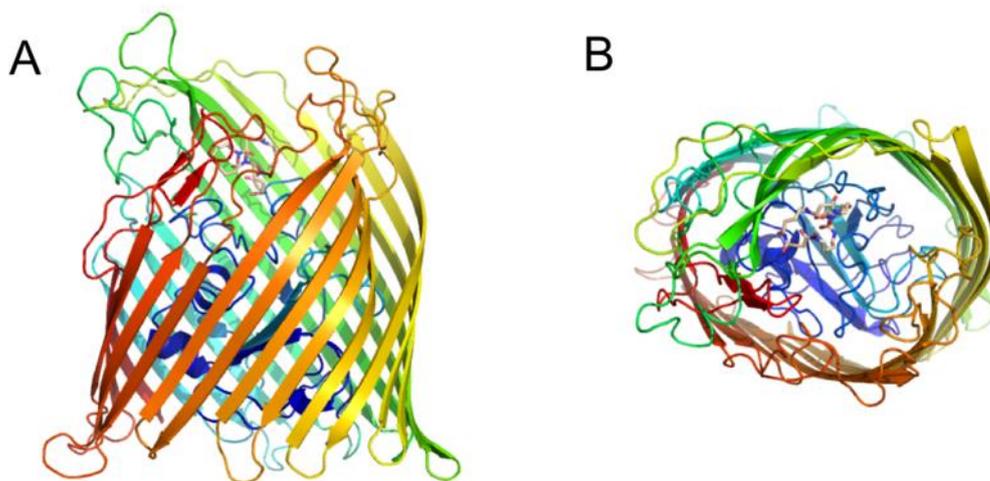


Figure 32 : Structure aux rayons X du complexe FoxA-NOCA-Fe (Normant *et al.*, 2020). La structure de FoxA-NOCA-Fe se compose d'un tonneau β à 22 brins, du domaine bouchon dans le lumen et de NOCA-Fe (en beige) lié au sommet du bouchon. La structure est représentée par un dégradé de couleur allant du bleu (N-terminus) au rouge (C-terminus). La structure est représentée vue de côté (A) et de haut (B).

Le locus *fox* est organisé en trois opérons dans le génome de PAO1 : *foxA* se situe entre l'opéron *foxI/foxR* (en amont) et l'opéron *foxB/PA2464* (en aval) (Figure 27). Le gène *PA2464* voisin de *foxB* est quant à lui de fonction inconnue.

Une Fur-box se trouve en amont de *foxA* et de *foxI*, permettant la régulation négative de la transcription des gènes de la voie d'import du fer par la NOCA, en cas de trop forte concentration intracellulaire en fer (Josts *et al.*, 2021; Llamas *et al.*, 2006). La détection et le transport de NOCA-Fe entraînent l'expression génétique de la voie d'acquisition, mais ne réprimerait l'expression des protéines d'aucune des voies endogènes d'absorption du fer (Normant *et al.*, 2020).

B1

1 CGGGGTCTATCGCCTGGACGACACCGACAAGCTGCTGCAGGTGCTCGCGC 50

51 GGACCCTGCCGGTGC GCCTGCAGCGACATACCCGCTGGTGGGTGAGGGTG 100

A1

101 GTCGCCGCCTGAGTCGCGCCGGCGCCGCGTGGACGCTTGCTTTCGTCCG 150

I1 Fur box I2

151 GAGCGAAACGCACTGAAAATTATTTTCATTATTTTTGTCGGCCTTCCGCG 200

201 ACTGGTCCGGCTTACCGATTGAACACCCTTCAACGACTCCAACGGATCC 250

251 CGTTCATG → *foxA*

Figure 33 : Région promotrice de *foxA*. Sont indiqués : le site de départ de la transcription de *foxA* (en gras et souligné), la Fur box, les séquences A1 et B1 retrouvées également dans le promoteur de *pfeA* et les sites de liaison probables de FoxI (I1-I2) (en gras, souligné et en italique).

2.2.2 La desferrioxamine B

La desferrioxamine B (DFOB) est un sidérophore tris-hydroxamate produit par la bactérie du sol *Streptomyces pilosus*. Sa structure chimique est proche de celle de la NOCA, à l'exception qu'elle est linéaire (Figure 34). La DFOB complexée au fer (DFOB-Fe) peut être transportée au travers de la membrane externe de *P. aeruginosa* par FoxA (Llamas *et al.*, 2006; Normant *et al.*, 2020). La structure cristalline de FoxA liant DFOB-Fe a révélé des interactions très similaires à celles de NOCA-Fe avec ce TBDT (Normant *et al.*, 2020). DFOB-Fe peut aussi être transporté au travers de la membrane externe par FpvB, le transporteur d'abord identifié comme le second transporteur du complexe PVDI-Fe, mais désormais caractérisé comme TBDT à large spectre de ligands hydroxamates (Chan and Burrows, 2022). La protéine FoxB, qui possède un rôle important dans l'assimilation du fer par NOCA-Fe, n'est pas essentielle pour l'assimilation du complexe DFOB-Fe. Cette réductase peut probablement être remplacée par une autre protéine qui a une fonction redondante dans d'autres voies d'acquisition du fer (Josts *et al.*, 2021; Ó Cuív *et al.*, 2007).

La présence de DFOB-Fe dans l'environnement de *P. aeruginosa* induit la transcription de *foxA* de la même façon que NOCA-Fe à une concentration de 10 µM (Josts *et al.*, 2021; Normant *et al.*, 2020).

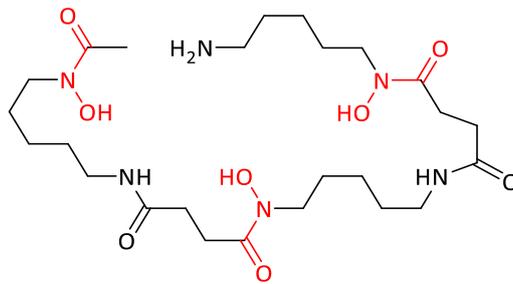
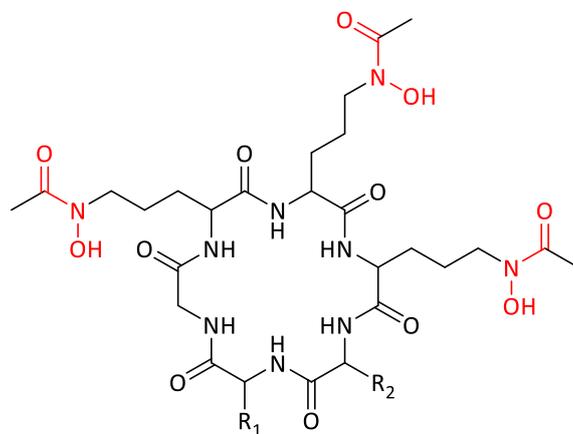


Figure 34 : Structure de la DFOB. Les fonctions hydroxamates sont représentées en rouge.

2.2.3 Le ferrichrome

Le ferrichrome (FERRI) est produit par divers mycètes des genres *Ustilago*, *Aspergillus* et *Penicillium*. FERRI est composé de trois résidus d'ornithine portant chacun un groupement hydroxamate liés par trois résidus de glycine fermant le macrocycle. La ferricrocine et la ferrichryisine sont des sidérophores dérivant du FERRI par des groupements supplémentaires au niveau du macrocycle (Figure 35).



	R ₁	R ₂
Ferrichrome	H	H
Ferricrocine	CH ₂ OH	H
Ferrichryisine	CH ₂ OH	CH ₂ OH

Figure 35 : Structure du FERRI et de ses dérivés. Les fonctions hydroxamates sont représentées en rouge.

Le complexe ferrichrome-Fe (FERRI-Fe) est importé dans le périplasme de *P. aeruginosa* par deux TBDT FiuA et FpvB (Chan and Burrows, 2022; Llamas *et al.*, 2006) (Figure 36). Une fois dans le périplasme, FERRI-Fe diffuse à travers la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de la perméase FiuB (Hannauer *et al.*, 2010a). Dans le cytoplasme, le fer est libéré du ferrichrome par un mécanisme impliquant une réduction du fer et une modification chimique du sidérophore (Hannauer *et al.*, 2010a). La réductase n'a pas été identifiée à ce jour. La modification du ferrichrome est une acétylation des fonctions chélatrices du fer par la N-acétyltransférase cytoplasmique FiuC (Hannauer *et al.*, 2010a). Après libération du fer, le FERRI acétylé est excrété dans le milieu extracellulaire par un mécanisme d'efflux non identifié. Dans le milieu extracellulaire, le chlorure de fer peut hydrolyser les groupements

acétyles du FERRI acétylé, lui rendant sa capacité à fixer du fer (le chlorure de fer agissant comme un acide de Lewis) (Hannauer *et al.*, 2010a). Suite à la chélation du fer ferrique, il peut être à nouveau absorbé par *P. aeruginosa*. La transcription des gènes codant pour les protéines de cette voie est induite par les facteurs σ /anti- σ FiuI et FiuR, et elle est réprimée par Fur (Llamas *et al.*, 2006) (Figure 27).

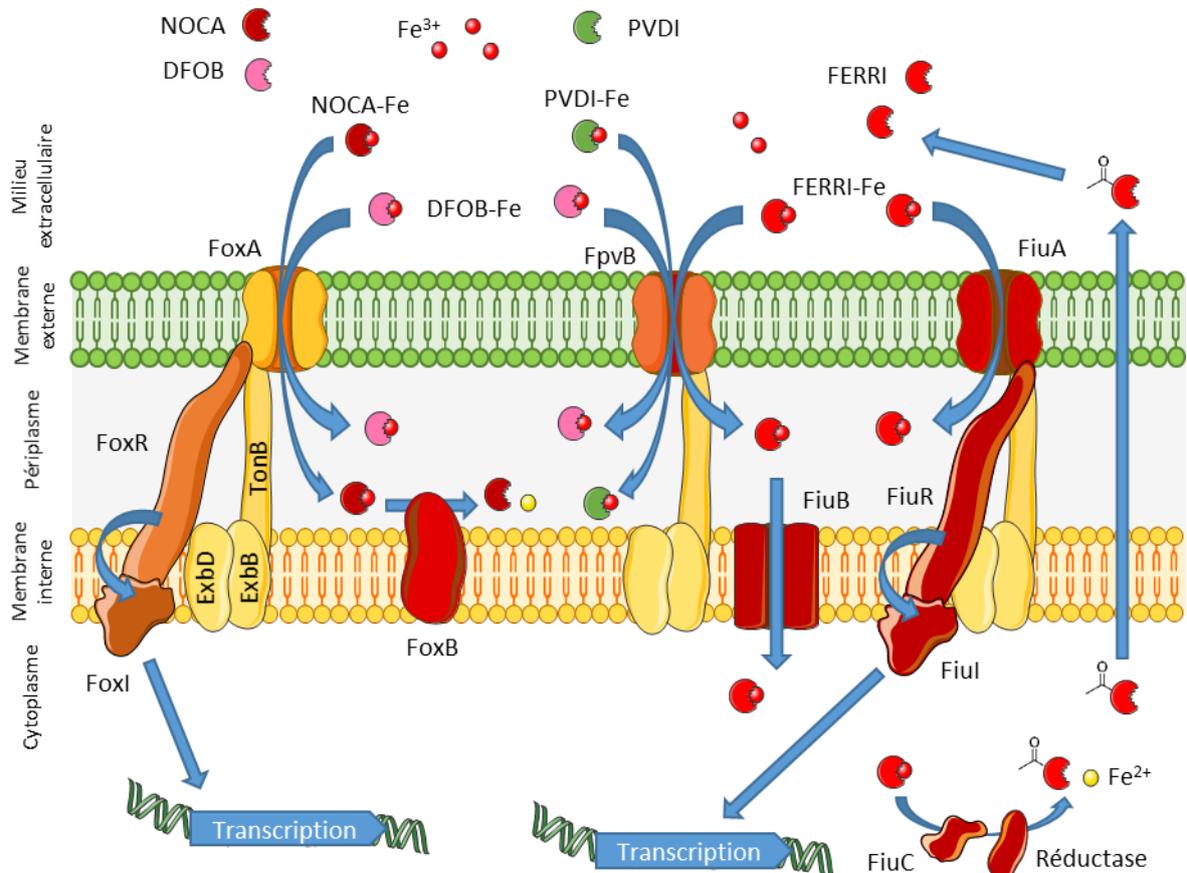


Figure 36 : Voie d'acquisition des sidérophores de type hydroxamate complexés au fer. NOCA : nocardamine, DFOB : desferrioxamine B, FERRI : ferrichrome, PVDI : pyoverdine I.

2.3 Voie de la vibriobactine

La vibriobactine (VIB) est un sidérophore produit par *Vibrio cholerae*. En plus des trois fonctions catéchol, la vibriobactine possède également deux fonctions oxazoline capables de chélater le fer (Figure 37).

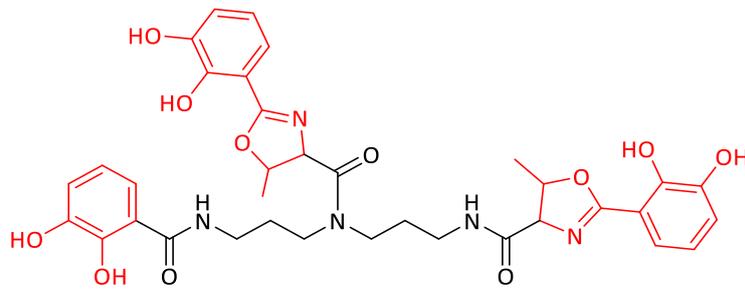


Figure 37 : Structure de la VIB. Les fonctions chélatrices du fer sont représentées en rouge.

Il est probable que la VIB a plusieurs manières de chélater le fer et différents complexes vibriobactine-Fe (VIB-Fe) coexistent en équilibre dans les conditions biotiques. Le TBDT FvbA, dont l'expression est régulée par Fur et le régulateur FvbR de type IclR, permet l'import du complexe VIB-Fe chez *P. aeruginosa* (Elias *et al.*, 2011) (Figure 27 et 38). Étant de type IclR, FvbR réprime la transcription de *fvbA*, et cette répression est levée par l'interaction de VIB-Fe, ou d'un métabolite associé, à FvbR (Elias *et al.*, 2011; Molina-Henares *et al.*, 2006). Le devenir du complexe VIB-Fe une fois dans le périplasme est inconnu, mais la localisation cytoplasmique du régulateur FvbR et sa capacité à lier un complexe VIB-Fe, tend à suggérer que VIB-Fe ou l'un de ses métabolites est capable de traverser la membrane interne pour se lier au régulateur. Dans le génome de *P. aeruginosa*, *fvbA* est situé directement en amont d'une hypothétique oxydoréductase cytoplasmique. Cette enzyme pourrait être impliquée dans la dissociation du complexe VIB-Fe en réduisant le fer ferrique en fer ferreux.

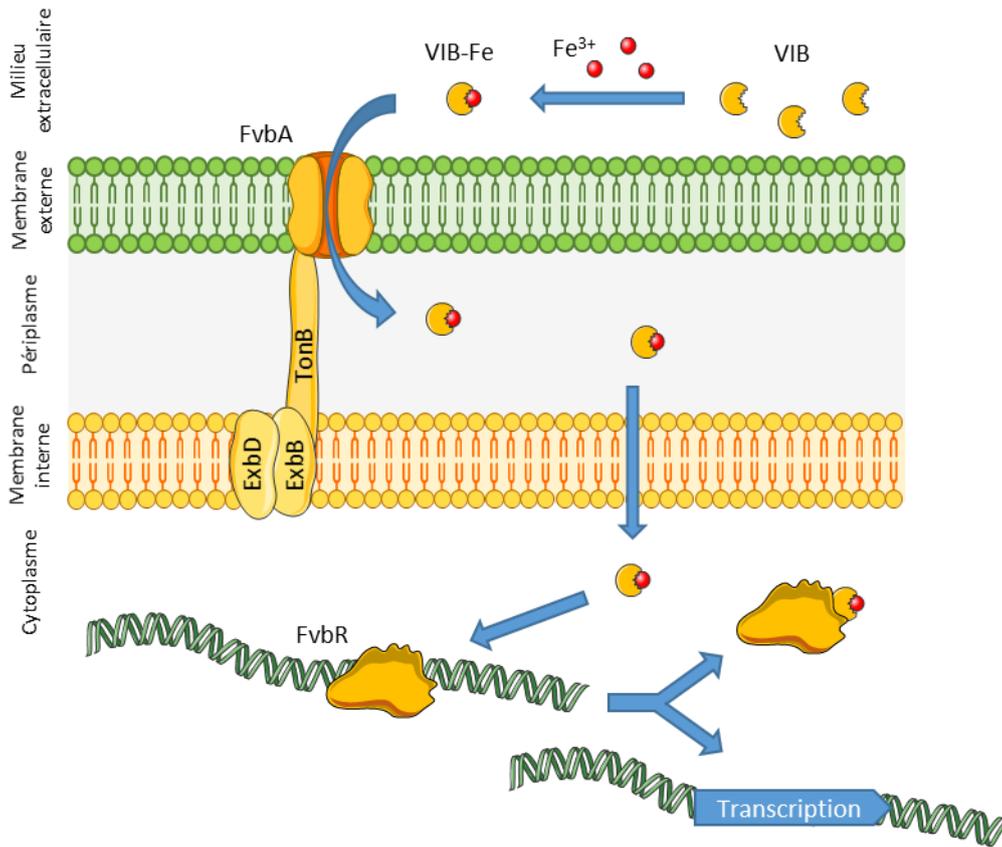


Figure 38 : Voie d'acquisition du complexe VIB-Fe.

2.4 Voie des mycobactines et carboxymycobactines

Les sidérophores mycobactine (MYCO) et carboxymycobactine (CMYCO) sont produits par les bactéries du genre *Mycobacterium* et représentent un mélange de molécules substituées par une chaîne d'acide gras de longueur et de position variables (Figure 39).

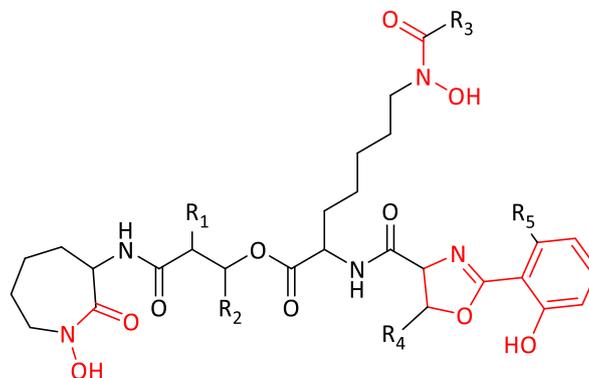


Figure 39 : Structure générale des MYCO et CMYCO. Les positions R₁ à R₅ sont substituées par des chaînes aliphatiques (Hider and Kong, 2010). Les fonctions chélatrices de fer sont représentées en rouge.

Les CMYCO se distinguent des MYCO par la présence d'un acide carboxylique à l'extrémité de la chaîne grasse. Les complexes mycobactine-Fe (MYCO-Fe) et carboxymycobactine-Fe (CMYCO-Fe) sont importés à travers la membrane externe de *P. aeruginosa* par le TBDT FemA (Llamas *et al.*, 2008) (Figure 40). Le gène *femA* est organisé en opéron avec *PA1909*, un gène pour lequel le produit est prédit être un homologue des réductases FpvG et FoxB, impliquées dans la réduction et dissociation du fer de PVDI-Fe et NOCA-Fe respectivement (Figure 27). *PA1909* pourrait jouer un rôle dans la dissociation du fer de la VIB en réduisant le fer. En aval de l'opéron *femA/PA1909* se trouve un autre opéron codant probablement pour une perméase de membrane interne et qui pourrait être impliqué dans l'import du fer dans le cytoplasme après réduction. La transcription de l'opéron *femA/PA1909*, est régulée par Fur et le système σ /anti- σ , FemI/FemR (Llamas *et al.*, 2008).

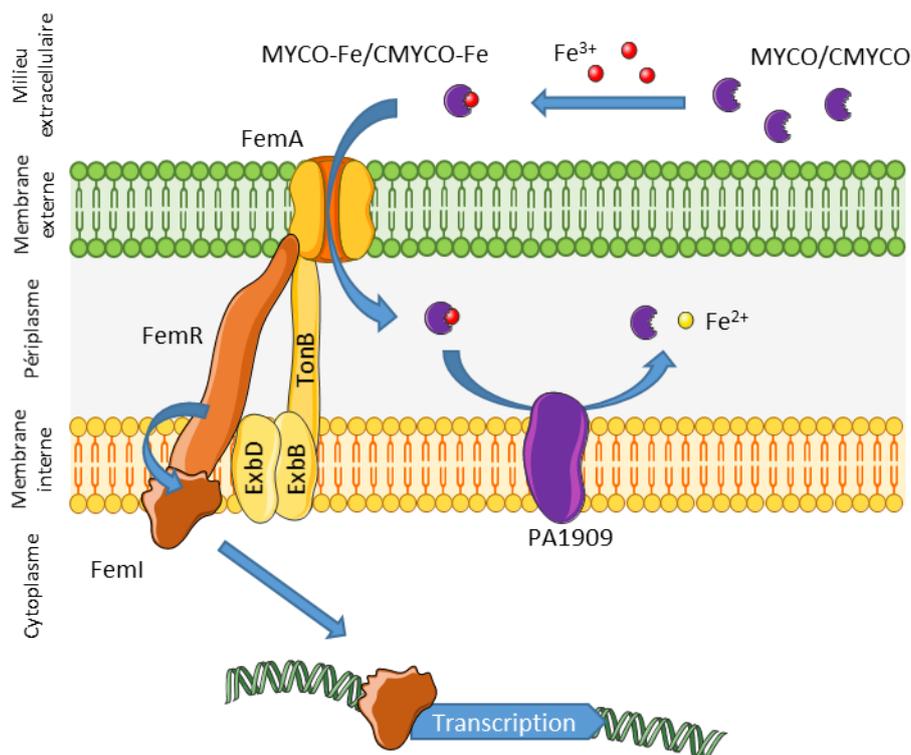


Figure 40 : Voie d'acquisition des complexes MYCO-Fe et CMYCO-Fe.

2.5 Voie de l'aérobactine, la schizokinen et la rhizobactine

L'aérobactine, la schizokinen et la rhizobactine 1021 sont des sidérophores qui possèdent deux groupements hydroxamates et un groupement α -hydroxycarboxylate (Figure 41). Ces sidérophores sont produits entre autres par *E. coli*, *Bacillus megaterium* et *Rhizobium meliloti*, respectivement (Årstøl and Hohmann-Marriott, 2019; Garénaux *et al.*, 2011; Persmark *et al.*, 2002). Les complexes de ces sidérophores avec le fer sont importés dans le périplasma de *P. aeruginosa* par le TBDT ChtA (Cuív *et al.*, 2006). Mis à part Fur, aucun système de régulation pour *chtA* n'a été identifié. Le gène *chtA* ne

fait partie d'aucun opéron et est isolé dans le génome, aucune autre protéine pouvant être impliquée dans cette voie d'acquisition du fer impliquant ChtA n'a pu être identifiée (Figure 27).

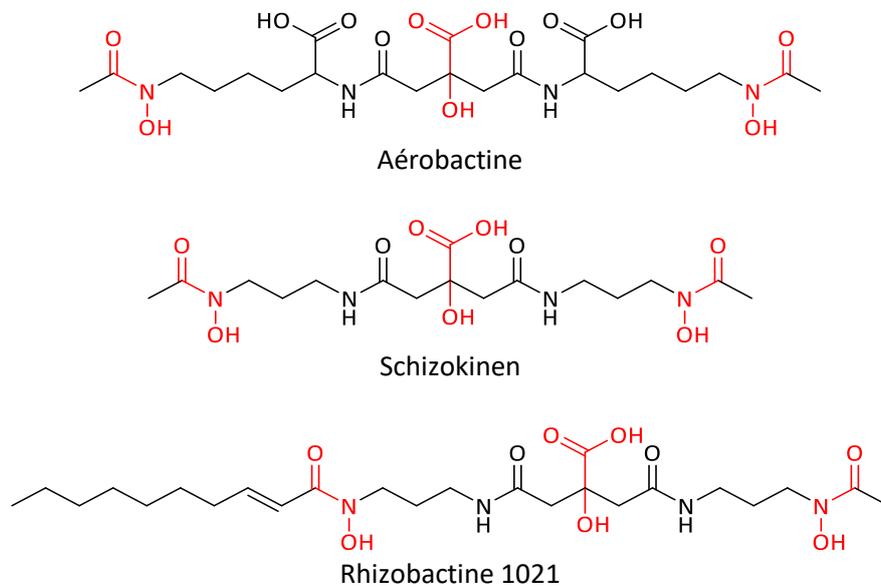


Figure 41 : Structures de sidérophores mixtes de type α -hydroxycarboxylate/hydroxamates. Les fonctions chélatrices de fer sont représentées en rouge.

3 Autres voies d'acquisition du fer

3.1 Voie du citrate

Le citrate, métabolite du cycle de Krebs, est capable de chélater le fer ferrique et de servir de sidérophore pour *P. aeruginosa*. Le TBDT permettant l'import des complexes citrate-Fe au travers de la membrane externe est FecA (Figure 42) (Marshall *et al.*, 2009).

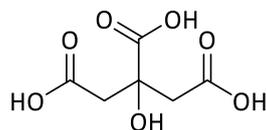


Figure 42 : Structure du citrate.

La stœchiométrie de chélation du fer par le citrate peut être variable, et par conséquent différents types de complexes citrate coexistent à l'état d'équilibre en solution. Cependant, seul le complexe citrate-Fe de stœchiométrie 2:1 ou 2:2 serait reconnu et transporté par FecA (Ferguson *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 2009). Une fois le complexe arrivé dans le périplasma, la dissociation du fer du citrate implique une réduction du métal par PcoA, une protéine périplasmique à activité oxydoréductase. Le

fer ferreux peut ensuite traverser la membrane interne *via* le transporteur FeoAB (Marshall *et al.*, 2009) (Figure 43). La transcription de *fecA* est régulée par le système σ /anti- σ FecI/FecR (Llamas *et al.*, 2008). Fur régule uniquement l'expression de l'opéron *fecI/fecR*, aucune Fur box n'est trouvée en amont de *fecA* (Figure 27).

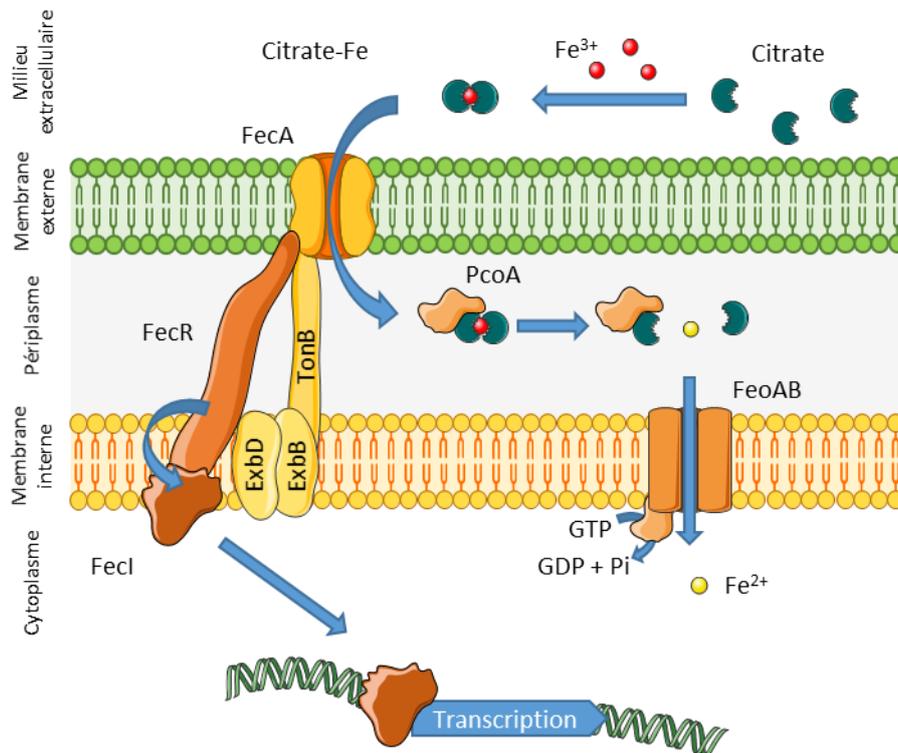


Figure 43 : Voie d'acquisition du complexe citrate-Fe. Le complexe citrate-Fe est représenté en stœchiométrie 2:1.

3.2 Voie de l'hème

L'hème est l'une des sources de fer les plus abondantes pour *P. aeruginosa* en système infectieux : 70 % du fer du corps humain est complexé avec l'hème. L'hème contient un atome de Fe^{2+} chélaté par une porphyrine (Figure 44). *P. aeruginosa* possède trois systèmes d'acquisition de l'hème : le système Phu (Pseudomonas heme uptake), Has (Heme-acquisition system) ainsi que le système Hxu (Normant *et al.*, 2022; Otero-Asman *et al.*, 2019a; Smith and Wilks, 2015) (Figure 45).

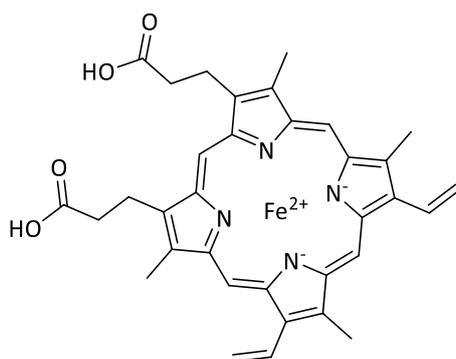


Figure 44 : Structure de l'hème B.

Concernant la voie Phu, l'hème est importé dans le périplasme par le TBDT PhuR, puis interagit avec la protéine de liaison périplasmique PhuT (Ochsner *et al.*, 2000). L'absorption à travers la membrane interne implique le transporteur ABC PhuUV (Ochsner *et al.*, 2000). Dans le cytoplasme, l'hème se lie à la protéine PhuS, puis HemO interagit avec le complexe PhuS-hème pour dégrader l'hème en biliverdine IX β et biliverdine IX δ (Mouriño *et al.*, 2016). Le rôle et la localisation cellulaire de la protéine codée par *phuW*, dernier gène de l'opéron *phuSTUVW*, ne sont pas connus. Aucun système de régulation spécifique n'a encore été identifié pour la transcription du système Phu.

Le système Has implique la sécrétion de l'hémophore HasAp qui peut extraire l'hème des hémoprotéines de l'hôte. Le complexe HasAp-hème est reconnu à la surface de la cellule bactérienne par le TBDT HasR (Centola *et al.*, 2020). Lorsque le complexe HasAp-hème-HasR est formé à la surface de la cellule, l'hème migre de la protéine HasAp à son site de liaison sur HasR. L'hème transféré dans le périplasme est ensuite reconnu par PhuT et transporté à travers la membrane interne par la voie PhuUV (Smith and Wilks, 2015). Le système Has est régulé par les facteurs σ /anti- σ HasI/HasS (Dent *et al.*, 2019). La sécrétion de HasAp dans l'environnement extracellulaire dépend d'un système d'efflux HasDe-OpmM (Yukl *et al.*, 2010).

Dans le cas du système Hxu, HxuA est exprimé en présence de fortes concentrations d'hème, et sa transcription est sous le contrôle des facteurs σ /anti- σ Hxul/HxuR (Otero-Asman *et al.*, 2019a). Le rôle exact de HxuA dans l'homéostasie de l'hème chez *P. aeruginosa* reste encore mal connu, mais ce TBDT aurait essentiellement un rôle de signalisation plutôt que de transport (Otero-Asman *et al.*, 2019a).

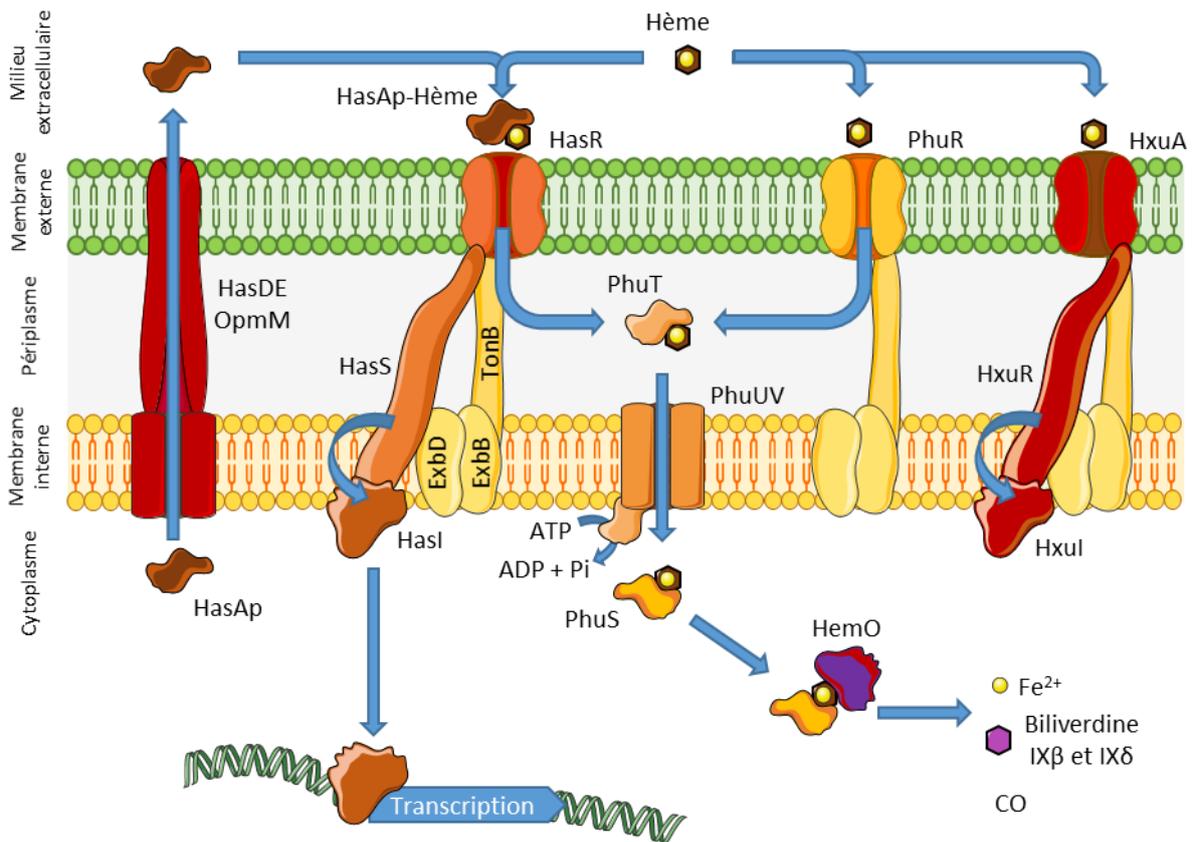


Figure 45 : Voie d'acquisition de l'hème.

3.3 Voie du *Pseudomonas* quinolone signal

La molécule *Pseudomonas quinolone signal* (PQS) est la molécule servant de signal de l'un des quatre systèmes du QS qui contrôle l'expression des gènes en réponse à la population de cellules bactériennes. Outre son rôle de molécule de signalisation pouvant déclencher l'expression de gènes pour la biosynthèse des sidérophores PVD et PCH (Popat *et al.*, 2017), le PQS est capable de chélater le fer ferrique grâce à son groupement salicylate (Bredenbruch *et al.*, 2006) (Figure 46).

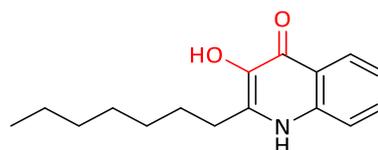


Figure 46 : Structure du PQS. La fonction chélatrice de fer est représentée en rouge.

Deux mécanismes sont liés au rôle du PQS dans l'homéostasie du fer. Pour le premier, le PQS fonctionne comme un piège à fer, le chélatant et le retenant au niveau de la surface cellulaire de *P. aeruginosa*. Le deuxième mécanisme nécessite l'effecteur TseF du système de sécrétion de type VI

(T6SS) de *P. aeruginosa*, qui semble relier le PQS à FptA, le TBDT du complexe PCH-Fe (Lin *et al.*, 2017), ou à la porine OprF (J. Lin *et al.*, 2018). Grâce à ce système, les vésicules de la membrane externe de *P. aeruginosa* peuvent abriter des molécules de PQS chélatant du fer avant d'être assimilées (Lin *et al.*, 2017) (Figure 47). L'importance de PQS dans l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa* doit encore être précisée.

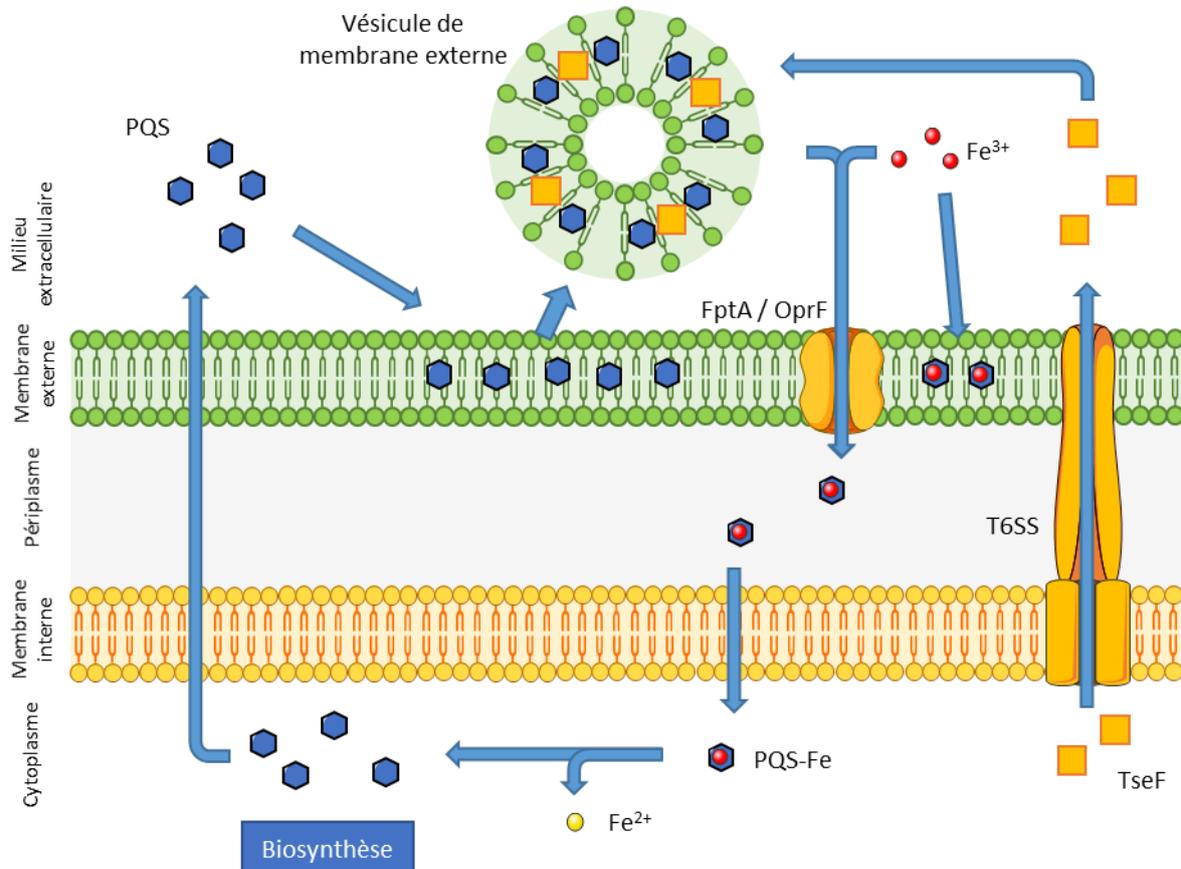
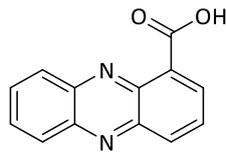


Figure 47 : Voie d'acquisition du fer par le système PQS.

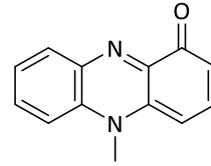
3.4 Voie du fer ferreux

Contrairement au Fe^{3+} , le Fe^{2+} est soluble en milieu aqueux, mais il n'est présent que dans des conditions anaérobies ou microaérobies. Le Fe^{2+} diffuse librement à travers la membrane externe par l'intermédiaire de la porine OprG (Chevalier *et al.*, 2017). Le fer est ensuite transporté dans le cytoplasme à travers la membrane cytoplasmique par FeoABC. Ce système protéique, présent chez de nombreuses bactéries Gram négatives, est composé de la perméase GTP-dépendant FeoB, de la protéine cytoplasmique FeoA qui permettent l'absorption du fer ferreux solubilisé, et de FeoC, un régulateur transcriptionnel de type LysR capable de se lier au Fe^{2+} (Lau *et al.*, 2016). En conditions anaérobies, *P. aeruginosa* produit également des phénazines (Figure 48), métabolites secondaires à

fort potentiel redox, qui, par leur oxydation, vont réduire spontanément le Fe^{3+} en Fe^{2+} dans l'environnement et ainsi alimenter l'absorption du fer *via* les porines (Wang *et al.*, 2011).



Acide phénazine-1-carboxylique



Pyocyanine

Figure 48 : Structures de phénazines produites par *P. aeruginosa*.

Les phénazines peuvent être recyclées et réduites dans le cytoplasme par l'oxydation de NADH (Price-Whelan *et al.*, 2007). Ces composés peuvent réduire le Fe^{3+} associé aux protéines de l'hôte comme la transferrine ou la lactoferrine (Wang *et al.*, 2011). Les neurotransmetteurs catécholamines peuvent également réduire le fer et stimuler l'absorption du Fe^{2+} *via* les perméases (Perraud *et al.*, 2022) (Figure 49).

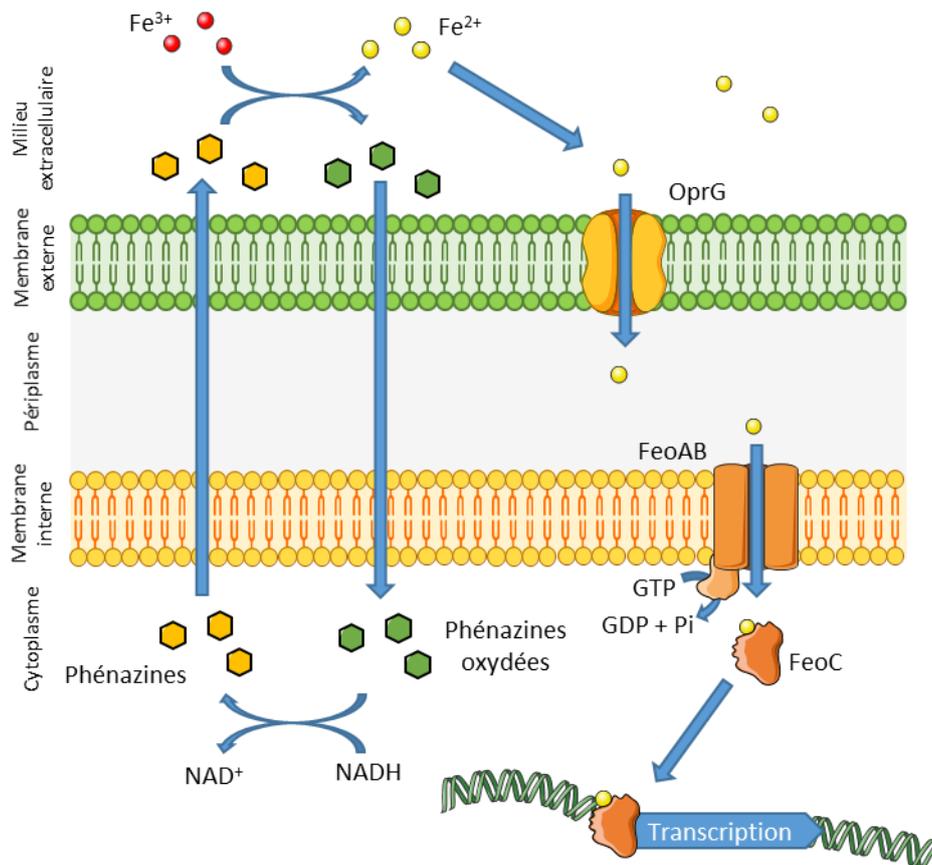


Figure 49 : Voie d'acquisition du fer ferreux.

Cette redondance des systèmes d'acquisition du fer (sidérophores, absorption de l'hème, du citrate et du Fe²⁺) chez *P. aeruginosa* lui permet de s'adapter et de survivre dans différents environnements où la concentration en fer est limitée. Sa capacité à utiliser de nombreux exosidérophores confère à *P. aeruginosa* un avantage compétitif non négligeable dans diverses niches où elle doit rivaliser avec d'autres micro-organismes pour le fer.

4 Voies d'acquisition de métaux autres que le fer

P. aeruginosa possède dans son génome des gènes codants pour des TBDT et des protéines impliquées dans des voies d'acquisition d'imports de métaux essentiels à son développement autres que le fer (Tableau 2). Les TBDT ZnuD, CirA et PA2911 sont capables de transporter les ions Zn²⁺ du milieu extracellulaire vers le périplasme (Pederick *et al.*, 2015). OprC importe de la même manière les ions Cu²⁺ (Yoneyama and Nakae, 1996). *P. aeruginosa* peut acquérir du cobalt en transportant la cobalamine (appelée aussi vitamine B12) *via* le TBDT BtuB (Crespo *et al.*, 2018; Shultis *et al.*, 2006). Pour acquérir du zinc et du nickel, *P. aeruginosa* utilise la pseudopaline et le TBDT CntO selon un système proche de celui de ses sidérophores endogènes (Gomez *et al.*, 2021; Lhospice *et al.*, 2017; Mastropasqua *et al.*, 2017; Pederick *et al.*, 2015).

La pseudopaline, molécule chimiquement apparentée à la nicotianamine végétale, appartient à la même famille de métalophores à large spectre de type opine que la staphylopine et la yersinopine synthétisées respectivement par *Staphylococcus aureus* et *Yersinia pestis* (Ghssein *et al.*, 2016; Laffont *et al.*, 2019; McFarlane *et al.*, 2018) (Figure 50). Cette molécule est produite et sécrétée par *P. aeruginosa* dans son environnement et elle est importée après avoir complexée du zinc ou du nickel (Lhospice *et al.*, 2017).

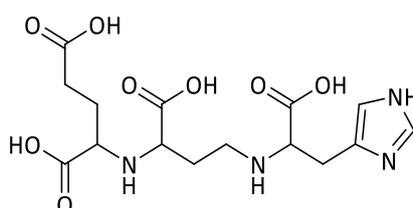


Figure 50 : Structure chimique de la pseudopaline.

Les gènes *cntOLMI* du génome de PAO1 codent pour les protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport de la pseudopaline (Lhospice *et al.*, 2017) (Figure 51). *cntL* et *cntM*, codent pour deux

enzymes cytoplasmiques responsables de la biosynthèse de ce métallope dans un processus en deux étapes. CntL synthétise le précurseur de la pseudopaline, appelé yNA, à partir de S-adénosine méthionine et de L-histidine. CntM catalyse une condensation réductrice au NADH de yNA avec une molécule d' α -cétoglutarate pour produire de la pseudopaline (Lhospice *et al.*, 2017; McFarlane and Lamb, 2017). *cntI* code pour un transporteur de la membrane cytoplasmique appartenant à la famille EamA, impliqué dans l'exportation de la pseudopaline du cytoplasme vers le périplasme après la biosynthèse (Lhospice *et al.*, 2017). Le métallope est ensuite exporté à travers la membrane externe *via* la pompe d'efflux MexAB-OprM (Gomez *et al.*, 2021). La pseudopaline complexée à du zinc ou du nickel est importée dans le périplasme par le TBDT codé par le gène *cntO* (Lhospice *et al.*, 2017; Mastropasqua *et al.*, 2017). Il a été suggéré que la pseudopaline libère le métal dans le périplasme, et que le métal libre soit transporté dans le cytoplasme par un système d'importation indépendant du métallope, tel que le transporteur ABC ZnuABC décrit pour l'importation du zinc (Gomez *et al.*, 2021; Pederick *et al.*, 2015). Les gènes *cntOLMI* sont regroupés dans un seul opéron régulé négativement par une forte concentration intracellulaire de zinc *via* le répresseur Zur (Zinc Uptake Regulator) (Lhospice *et al.*, 2017; Pederick *et al.*, 2015). Zur est un régulateur de la même famille que Fur et a un rôle central dans l'homéostasie du zinc chez *P. aeruginosa* (Patzner and Hantke, 1998; Pederick *et al.*, 2015).

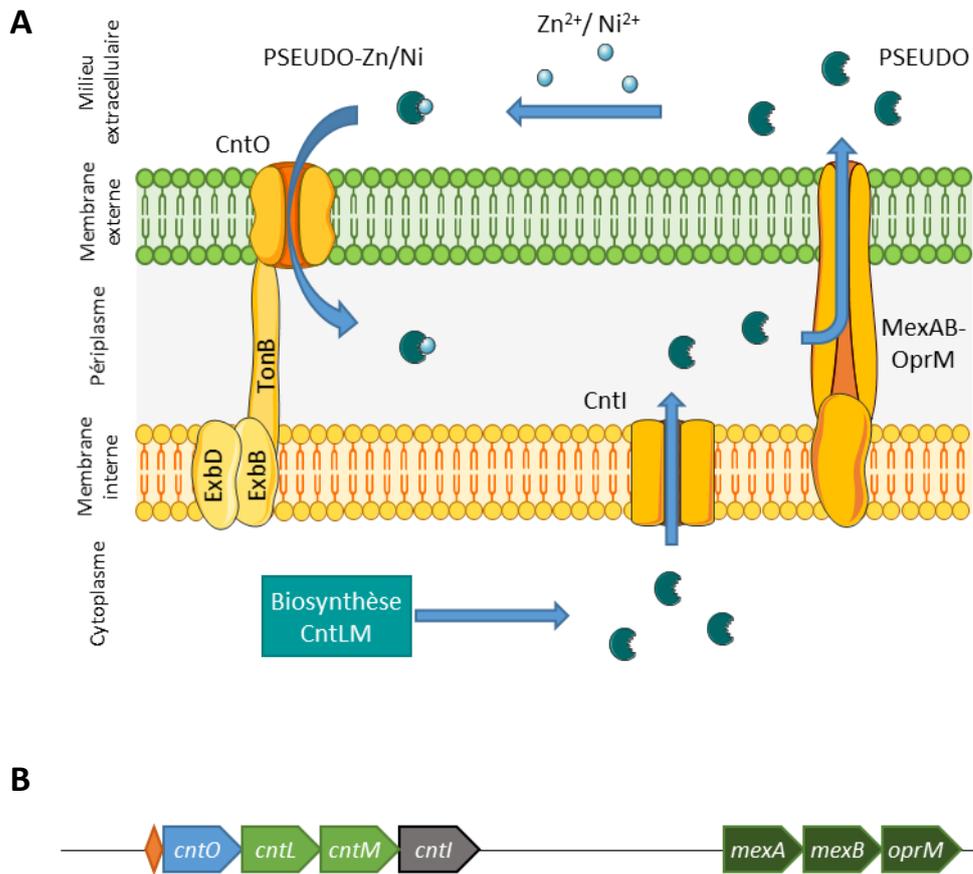


Figure 51 : Voie d'acquisition de la pseudopaline complexée au zinc ou au nickel. (A) Schéma de la voie d'acquisition, PSEUDO : pseudopaline, PSEUDO-Zn/Ni : pseudopaline complexée au zinc ou au nickel. (B) Organisation des opérons *cntOLMI* et *mexABoprM* chez PAO1. Les gènes impliqués dans la biosynthèse sont en vert, le gène codant pour le TBDT CntO est en bleu, le dernier gène de l'opéron est en gris, la Zur-box est représentée par un losange orange. Les gènes impliqués dans la sécrétion sont en vert foncé. Les gènes représentés en contact direct sont regroupés dans le même opéron.

Les ligands des autres TBDT présents chez *P. aeruginosa* n'ont pas encore été identifiés. Ces TBDT sont potentiellement impliqués dans l'import de divers métaux, y compris le fer. Des études futures seront nécessaires pour déterminer les ligands spécifiques et les rôles de ces TBDT dans les processus métaboliques de *P. aeruginosa*.

5 Les switches phénotypiques concernant l'expression des voies d'import du fer

P. aeruginosa a développé et acquis au cours de l'évolution un nombre impressionnant de stratégies différentes d'acquisition du fer. Toutes ces voies ne sont pas exprimées simultanément par la bactérie, mais *P. aeruginosa* va exprimer selon son environnement la ou les voie(s) les plus apte(s) à lui fournir du fer (Perraud *et al.*, 2020b). Elle déploie des mécanismes sophistiqués et complexes de régulation afin d'optimiser l'utilisation des sidérophores disponibles et produits par d'autres espèces bactériennes. Ces systèmes de régulation interagissent entre eux pour ajuster finement l'expression des voies d'acquisition spécifiques (Cornelis *et al.*, 2009). La présence de ces diverses stratégies d'acquisition du fer au niveau du chromosome implique une possibilité d'adaptation phénotypique impressionnante. Cette adaptation phénotypique de *P. aeruginosa* est essentielle pour sa survie et sa compétitivité, elle lui permet de maintenir une croissance optimale dans des environnements où la disponibilité du fer est limitée, tout en conservant un avantage compétitif avec d'autres micro-organismes pour l'accès à cette ressource vitale (Haas *et al.*, 2023; Leinweber *et al.*, 2018). La production de PVD est influencée par diverses conditions physiques : la concentration intracellulaire en fer est évidemment un facteur clé, mais d'autres facteurs tels que le pH, la température, l'état de croissance (planctonique ou en biofilm), le degré d'oxygénation du milieu (aérobie, microaérobie ou anaérobie), la nature de la source de carbone et la densité de population peuvent être des déterminants importants (Butaité *et al.*, 2018).

Concernant l'adaptation de *P. aeruginosa* à la concentration intracellulaire de fer, le régulateur transcriptionnel Fur joue un rôle essentiel, en régulant la transcription de tous les gènes impliqués dans l'homéostasie du fer. C'est très certainement ce régulateur Fur qui va permettre à la bactérie une transition phénotypique de la production de PCH lorsque le fer n'est que modérément limité à la production de PVD en cas de forte limitation en fer (Dumas *et al.*, 2013). Ceci suggère que la PCH n'est pas redondante avec la PVD, mais plutôt une alternative bénéfique pour ajuster l'efficacité et les coûts énergétiques liés à la biosynthèse de ses sidérophores endogènes et à l'expression des protéines impliquées dans leur voie d'acquisition du fer respective.

Dans la régulation de l'expression de ces différentes voies d'import du fer, la détection de la présence d'exosidérophores produits par d'autres espèces bactériennes joue un rôle déterminant (Perraud *et al.*, 2020b). Uniquement les formes ferriques de ces exosidérophores sont détectées par *P. aeruginosa* et la détection se fait à différents niveaux. Pour les voies régulées par les facteurs σ /anti- σ , c'est la liaison du complexe exosidérophore-Fe à son TBDT à la surface de la bactérie qui va activer la transcription des gènes impliqués dans la voie (Brillet *et al.*, 2007; Normant *et al.*, 2020). Pour les

systemes à deux composantes, le complexe exosidérophore-Fe doit rentrer dans le périplasme et interagir avec le senseur localisé dans la membrane interne (Gasser *et al.*, 2021; Luscher *et al.*, 2022; Perraud *et al.*, 2018). Et enfin, pour les régulateurs transcriptionnels de type AraC et IclR, le complexe exosidérophore-Fe doit aller jusqu'au cytoplasme pour être détecté par ce système de régulation (Elias *et al.*, 2011; Michel *et al.*, 2005). Pour permettre l'acquisition des sidérophores et exosidérophores complexés au fer et leur détection, toutes les voies sont exprimées à un niveau basal, et par conséquent tous les TBDTs impliqués dans l'acquisition du fer sont présents à la surface de la bactérie. Lorsque la présence d'un sidérophore ou exosidérophore chélaté au fer est détectée, le système de régulation va se déclencher. Les gènes codant pour les protéines impliquées dans la voie d'acquisition du fer, et en particulier ceux codant pour le ou les TBDT spécifique(s), sont surexprimés. Dans le cas des voies d'exosidérophores, la surexpression de la voie peut être induite parallèlement à la répression de l'expression des voies d'acquisition et de biosynthèse de la PCH, mais pas celles de la PVD (Gasser *et al.*, 2016; Perraud *et al.*, 2020b). Cette adaptation phénotypique est représentée par la Figure 52.

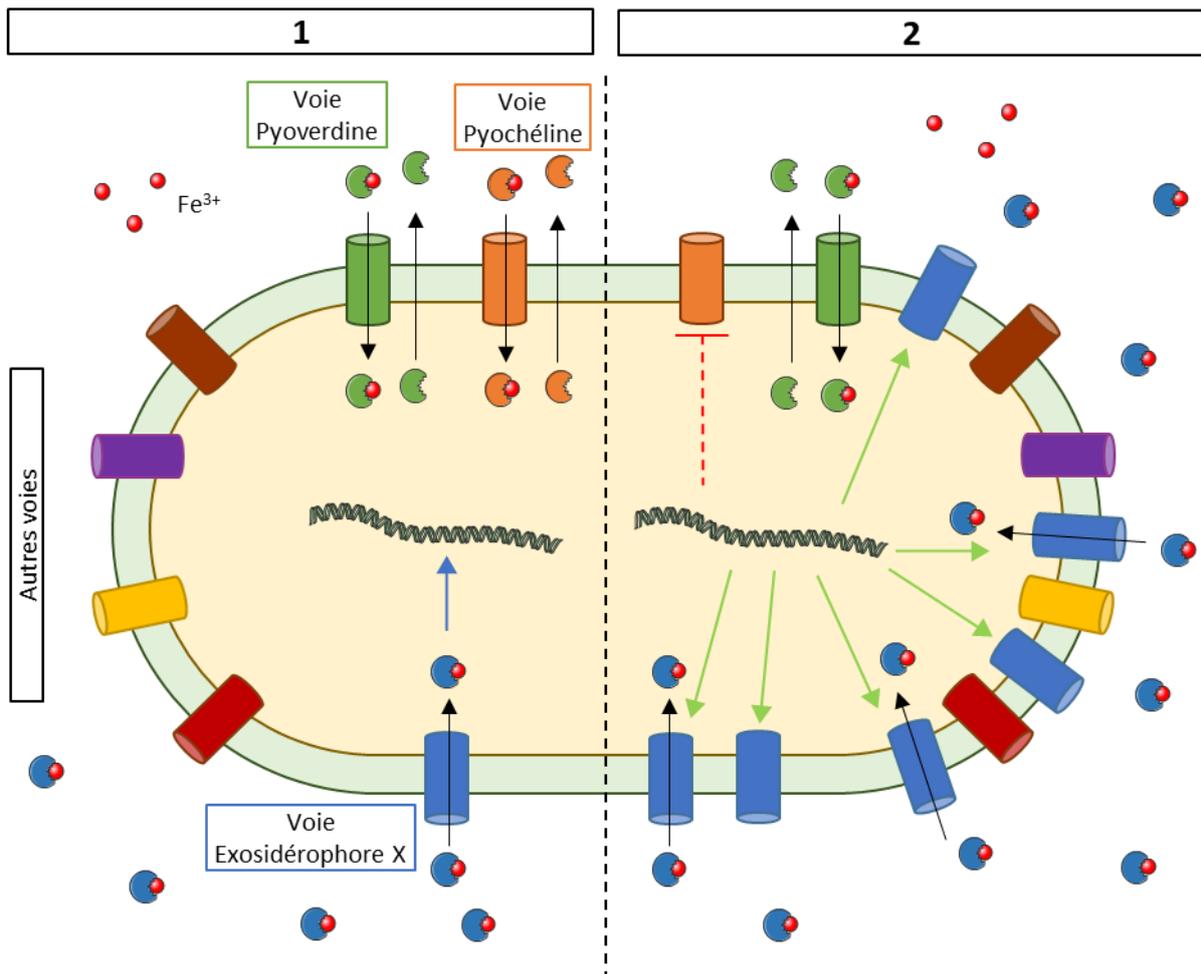


Figure 52 : Mécanisme d'adaptation phénotypique de l'expression des voies d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* en présence d'exosidérophores. (1) En absence d'exosidérophores, l'expression des voies d'acquisition du fer par les sidérophores endogènes est active, permettant à la bactérie d'acquérir du fer de l'environnement, tandis que l'expression de toutes les autres voies d'acquisition du fer est exprimée à un niveau basal. Tous les TBDT codés dans le génome sont présents à la surface de la bactérie. (2) Lorsque la bactérie détecte un complexe exosidérophore X-Fe et qu'elle est capable de l'importer, le mécanisme d'adaptation phénotypique est déclenché. L'expression de l'ensemble des protéines de la voie d'acquisition du fer par cet exosidérophore est activée. Dans certains cas, cela va de pair avec la répression de l'expression des gènes des voies de la PCH, tandis que l'expression des gènes des voies de la PVD n'est jamais modifiée.

Chapitre IV :
Sidéromycines naturelles et synthétiques,
stratégie du Cheval de Troie

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries a rendu urgent le développement de nouveaux antibiotiques ou de nouvelles stratégies thérapeutiques. Un des freins majeurs dans le développement de nouveaux antibiotiques est la capacité des molécules développées à traverser la paroi bactérienne. Cette situation est particulièrement dramatique dans le cas des bactéries à Gram négatif qui, du fait de leur membrane externe, sont encore plus imperméables aux molécules que les bactéries à Gram positif. Les voies d'import du fer *via* les sidérophores sont souvent proposées comme voie d'entrée possible d'antibiotiques et plus particulièrement dans une stratégie de cheval de Troie, où la molécule d'antibiotique est greffée de manière covalente à un sidérophore. Lorsque le sidérophore importe un ion ferrique, il importe également la molécule d'antibiotique. Dans cette stratégie, le sidérophore est utilisé comme un vecteur permettant le transport de l'antibiotique.

1 Sidéromycines naturelles

Au fil de l'évolution, les micro-organismes ont développé des composés sidérophore-antibiotiques pour éliminer des bactéries concurrentes. Ces molécules sont appelées sidéromycines et sont composées d'un analogue de sidérophore lié de façon covalente à une molécule antibiotique (Braun *et al.*, 2009; Knüsel and Nüesch, 1965; Wencewicz and Miller, 2018). La première sidéromycine naturelle rapportée est la griséine, découverte en 1948, isolée à partir d'une souche de *Streptomyces griseus* (Reynolds and Waksman, 1948). Cette molécule, par la suite appelée albomycine, possède une partie sidérophore avec des fonctions hydroxamates pour chélater le fer (Figure 53) (Pramanik and Braun, 2006), et une partie antibiotique thioribosyl-pyrimidine qui inhibe la séryl-ARNt synthétase, stoppant la synthèse protéique et entraînant la mort cellulaire (Zeng *et al.*, 2009). L'action antibiotique de l'albomycine est efficace contre des bactéries à Gram positif telles que *Streptococcus pneumoniae* et *S. aureus*, et à Gram négatif comme *Yersinia enterocolitica* et *E. coli* (Z. Lin *et al.*, 2018; Pramanik *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2022). L'albomycine est importée dans *P. aeruginosa* *via* le TBDT FiuA sans être efficace contre cette bactérie (Braun *et al.*, 2009; Perraud *et al.*, 2020a). En s'inspirant de ces conjugués naturels, diverses stratégies ont été utilisées pour générer des analogues biologiques, semi-synthétiques ou entièrement synthétiques de sidéromycines (Mislin and Schalk, 2014).

2 Sidéromycines synthétiques

2.1 Le céfidérocol

Le céfidérocol est le premier et le seul sidérophore-antibiotique sur le marché. Cette molécule s'est montrée efficace *in vivo* dans divers modèles d'infection murins contre les bactéries à Gram négatif multi-résistantes aux antibiotiques, y compris les *Enterobacteriaceae* résistantes aux carbapénèmes, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. (Ito *et al.*, 2016). Il est commercialisé sous le nom de Fetroja®, et est un antibiotique de dernier recours réservé aux patients atteints de pneumonie ou d'infection urinaire sévères causées par ces bactéries multi-résistantes. Le céfidérocol est composé d'une céphalosporine liée à un groupement catéchol chloré permettant la chélation du fer (Figure 53). La céphalosporine est un antibiotique de la famille des β -lactamines, elle inhibe la synthèse du peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif et Gram positif (Bush and Bradford, 2016). En complexe avec le fer, le céfidérocol est importé dans le périplasme de *P. aeruginosa* via les TBDT PiuA et PirA, voir aussi par PA0434 et FemA (Ito *et al.*, 2017; Luscher *et al.*, 2018).

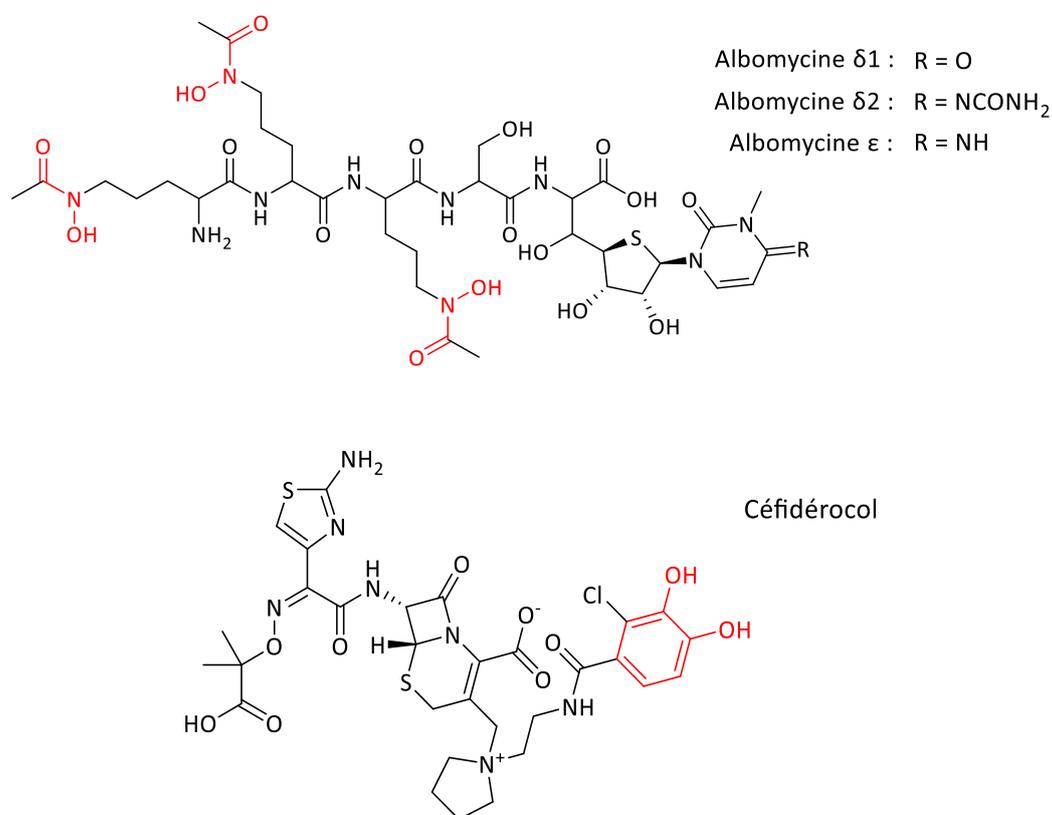


Figure 53 : Structures des albomycines et du céfidérocol. Les fonctions chélatrices sont représentées en rouge.

2.2 Sidéromycines synthétiques en développement

La vectorisation d'antibiotiques par des analogues de sidérophores est une stratégie prometteuse pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Des analogues de la PVD (Hennard *et al.*, 2001; Kinzel *et al.*, 1998; Kinzel and Budzikiewicz, 1999) et de la PCH (Noël *et al.*, 2011; Rivault *et al.*, 2007; Zamri and Abdallah, 2000), ainsi que des hydroxamates (Al Shaer *et al.*, 2020; Wencewicz *et al.*, 2013; Zähler *et al.*, 1977) ont été testés dans des stratégies de cheval de Troie. Cependant, des vecteurs analogues de sidérophores avec des catéchols comme fonction chélatrices du fer ont essentiellement été développés, car les sidérophores de ce type ont une grande affinité pour Fe^{3+} et sont capables d'importer le fer dans de nombreuses espèces et souches bactériennes (Klahn *et al.*, 2022; Sanderson *et al.*, 2020; Zscherp *et al.*, 2021). Le TCV (*Tris-Catechol Vector*), le MECAM (1,3,5-N,N',N''-tris-(2,3-dihydroxybenzoyl)-triaminométhylbenzène) et DOTAM (1,4,7,10-tetrakis(carbamoylméthyl)1,4,7,10-tetraazacyclododécane) (Figure 54) sont des sidérophores synthétiques à trois groupements catéchols qui peuvent être utilisés comme vecteur de molécules pour de multiples applications chez *P. aeruginosa* (Fritsch *et al.*, 2022; Moynié *et al.*, 2022; Pinkert *et al.*, 2021). Ces trois molécules peuvent chélater le fer et l'importer dans les cellules de *P. aeruginosa* via le TBDT PfeA pour le TCV et le MECAM et PirA pour le DOTAM (Fritsch *et al.*, 2022). La présence de ces molécules dans l'environnement de *P. aeruginosa* induit l'expression des gènes *pfeA* pour le TCV et le MECAM et *pirA* pour le DOTAM (Fritsch *et al.*, 2022; Gasser *et al.*, 2016). Cette induction de l'expression de *pfeA* en présence de TCV chez *P. aeruginosa* ou, par ailleurs, de *fiuA* en présence d'albomycine, se fait même dans un système d'infection de cellules épithéliales (Perraud *et al.*, 2020a).

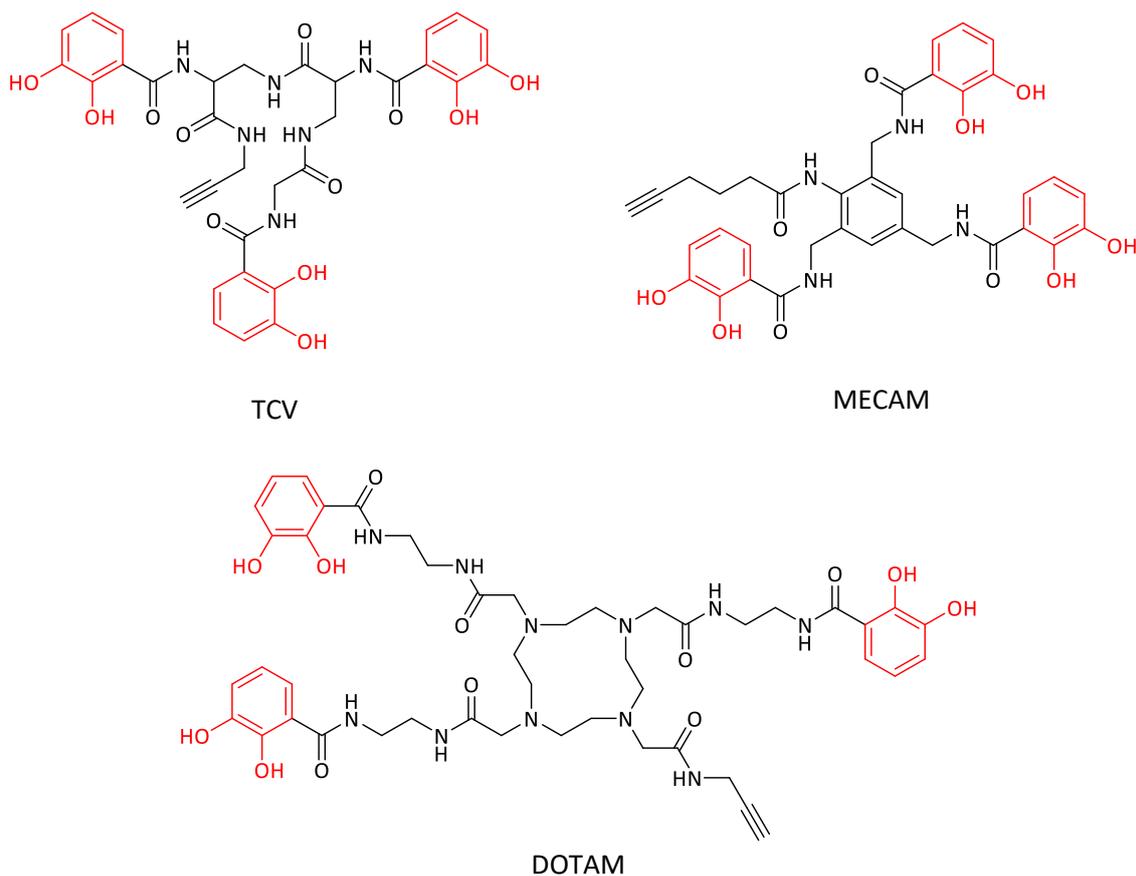


Figure 54 : Structure des vecteurs TCV, MECAM et DOTAM. Les fonctions chélatrices sont représentées en rouge.

Pour développer efficacement des stratégies de cheval de Troie utilisant des analogues de sidérophores pour la vectorisation d'antibiotiques, il est essentiel de comprendre en profondeur la régulation de l'expression génétique des TBDT. L'analyse de cette régulation peut fournir des informations précieuses concernant le choix du vecteur qu'il faudrait utiliser. En étudiant l'expression des TBDT dans différentes conditions expérimentales, il est possible de déterminer quels transporteurs sont surexprimés dans des contextes particuliers, quels sont leurs niveaux d'expression, et voir ainsi des schémas d'expression. Cette connaissance permet de sélectionner les vecteurs sidérophores qui utilisent les TBDTs appropriés pour une vectorisation optimale. En comprenant la régulation des TBDT, il est donc possible d'optimiser la conception des vecteurs et d'améliorer l'efficacité des stratégies de cheval de Troie dans le contexte de la délivrance ciblée d'agents antibiotiques.

Chapitre V :

Modélisation mathématique des
mécanismes biologiques de *P. aeruginosa*

1 La modélisation dans le domaine de la biologie

Au tournant des années 2000, l'émergence de la modélisation mathématique dans le domaine de la biologie a été largement favorisée par plusieurs facteurs clés. D'une part, les capacités grandissantes des ordinateurs ont permis de traiter des quantités massives de données biologiques, nécessitant des analyses automatisées et une approche plus systémique. D'autre part, la complexité croissante des systèmes biologiques étudiés a rendu l'analyse manuelle des données délicate et a créé un besoin d'outils plus sophistiqués pour les comprendre (Motta and Pappalardo, 2013; Stelling, 2004).

L'émergence de la modélisation mathématique en biologie a également été alimentée par le développement de projets pluridisciplinaires à l'interface entre la biologie, les mathématiques et l'informatique. Ces projets interdisciplinaires ont permis de réunir des experts de différents domaines pour collaborer sur des questions biologiques complexes et ont conduit à des avancées significatives dans le domaine de la modélisation mathématique en biologie (Chelliah *et al.*, 2015; Stelling, 2004).

Plusieurs domaines spécifiques ont émergé de cette synergie entre la biologie et les mathématiques, tels que la biologie des systèmes, la biologie computationnelle et la bioinformatique (Ingalls, 2013). La biologie des systèmes vise à comprendre et à modéliser les interactions complexes entre les composants biologiques afin de prédire et de manipuler les réponses des systèmes biologiques (Carvunis *et al.*, 2009; Kitano, 2002). La biologie computationnelle combine des approches mathématiques et informatiques pour résoudre des problèmes biologiques complexes. Elle implique l'élaboration et l'utilisation de méthodes d'analyse de données, de modélisation mathématique, de simulations et d'approches théoriques pour étudier les systèmes biologiques (Motta and Pappalardo, 2013; Torres and Santos, 2015). La bioinformatique utilise des méthodes mathématiques pour traiter et analyser les données biologiques (Gauthier *et al.*, 2019).

Les modèles mathématiques et informatiques sont de plus en plus utilisés pour aider à interpréter les données générées par des approches à haut débit. L'application de modèles informatiques avancés permet la simulation de processus biologiques complexes, génère des hypothèses et suggère des nouvelles expériences. Les modèles informatiques sont mis en place pour exploiter la richesse des données. Les équipes de recherche en biologie se tournent de plus en plus vers la modélisation, elles s'intéressent activement à la collecte et à la centralisation des bases de données de modèles grâce à la plateforme BioModels par exemple (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>), ainsi qu'à la standardisation des formalismes de description des systèmes biologiques comme par exemple SBML (<https://sbml.org/>) et à la mise au point d'outils de simulation tels que COPASI (<https://copasi.org/>) ou

BB-SPICE (Madec *et al.*, 2017). Cette approche leur permet d'explorer et de comprendre les systèmes biologiques de manière efficace et de faciliter la collaboration entre chercheurs. Ces méthodes ont été utilisées pour étudier la dynamique des populations, les réseaux de régulation génétique, les voies de signalisation cellulaire et bien d'autres aspects de la biologie (Alon, 2007; Madec *et al.*, 2021; Tyson *et al.*, 2001).

2 Modèles de différents mécanismes biologiques de *P. aeruginosa*.

La résistance aux antibiotiques et la formation de biofilm de *P. aeruginosa* ont été largement étudiées et modélisées (Biggs and Papin, 2013; Dunphy *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2018). Les réseaux de régulation du QS ont également fait l'objet de tentatives de modélisation (Dockery and Keener, 2001). Concernant son acquisition du fer, des modèles mathématiques ont été développés pour comprendre et prédire certains aspects. Par exemple, une équation a été établie pour relier le taux de production de PVD de *P. fluorescens* à la disponibilité du fer et au taux de croissance des bactéries (Fgaier *et al.*, 2008). L'effet inhibiteur de croissance des bactéries compétitrices par la production de PCH et l'absorption du fer de l'environnement ont également été modélisés (Schiessl *et al.*, 2017). De plus, des modèles mathématiques ont été élaborés pour étudier le taux d'absorption du fer par les bactéries productrices de sidérophores en fonction de la solubilité du fer et du taux de production de sidérophores (Leventhal *et al.*, 2019). Enfin, un modèle mathématique a été développé pour étudier la production et la chélation de sidérophores, ainsi que la compétition inter-espèces au sein d'un biofilm (Eberl and Collinson, 2009). Ces différentes approches de modélisation ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes associés à l'acquisition du fer de *P. aeruginosa* dans des systèmes complexes. En revanche, il existe peu de données disponibles dans la littérature concernant l'adaptation phénotypique de *P. aeruginosa* et la régulation de son métabolisme d'acquisition du fer. Nous abordons un aspect non exploré de la biologie de *P. aeruginosa* en cherchant à développer un modèle de la régulation des voies d'acquisition du fer, qui fait défaut dans la littérature scientifique.

Problématique du projet de thèse

À ce jour, la manière dont *P. aeruginosa* adapte la transcription et l'expression des gènes codant pour les TBDT et pour les différentes autres protéines impliquées dans l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* n'a été étudiée que par notre équipe ou celle de M. A. Llamas. Les études existantes dans la littérature sur ce sujet ont principalement été menées en présence d'un exosidérophore spécifique ou d'un mélange d'au maximum quatre exosidérophores, à des concentrations spécifiques et à un temps déterminé de la culture. L'expression a été suivie par analyses protéomiques et à l'aide des techniques de qRT-PCR (Gasser *et al.*, 2016; Llamas *et al.*, 2008; Normant *et al.*, 2020, 2022; Perraud *et al.*, 2020b, 2022). Cependant, les mécanismes précis par lesquels les bactéries sélectionnent, régulent, optimisent et coordonnent l'expression de leurs différentes voies de transport en réponse à leur environnement extérieur restent largement méconnus, notamment en ce qui concerne la présence de concentrations variables d'exosidérophores ou de mélanges d'exosidérophores.

Dans le cadre de ce projet de thèse, notre objectif a été d'aller plus loin dans la compréhension de l'adaptation de l'expression de ces différentes voies d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* à l'aide de modélisation informatique. Une telle approche a de multiples avantages. D'une part, la modélisation mathématique permet de formaliser la récolte des données et leur fusion lorsque celles-ci proviennent de techniques instrumentales différentes. D'autre part, elle permet d'orienter le plan d'expérience, mettant en lumière à chaque itération les faiblesses du modèle et donc les expériences à réaliser pour les combler. Enfin, à terme, le modèle mathématique dispose d'une capacité de prédiction des voies exprimées en fonction de l'environnement de la bactérie (Figure 55). C'est l'objectif ultime du projet dans la mesure où, pour utiliser ces voies d'import du fer pour importer des antibiotiques *via* les sidérophores, il est essentiel de mieux comprendre cette adaptation phénotypique et d'identifier la ou les voie(s) d'import du fer les mieux adaptée(s) à cette stratégie de cheval de Troie.

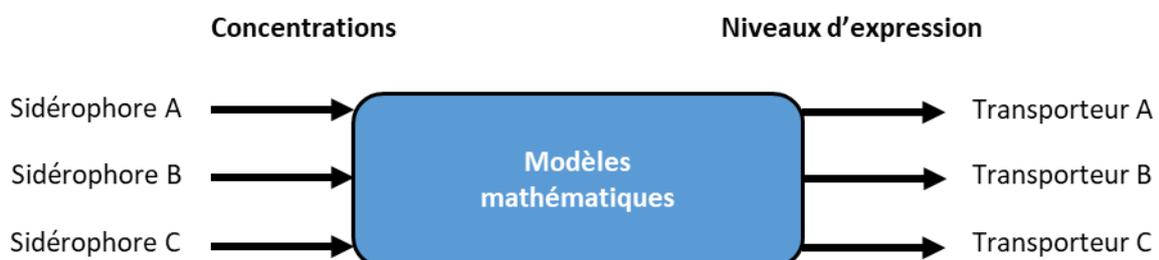


Figure 55 : Schéma du fonctionnement du modèle.

Construire un tel modèle mathématique implique dans un premier temps de générer de nombreuses données expérimentales, ce qui nécessitera la mise au point de méthodes de mesure innovantes, plus

rapides et moins onéreuses que la protéomique ou la qRT-PCR. Le travail de thèse se focalise donc sur la mise au point de ces nouvelles méthodes, leur validation en comparaison avec les méthodes standards sur la base de modèles mathématiques et la mise au point du modèle informatique en y intégrant progressivement les données expérimentales.

PARTIE II :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Matériel et méthodes biologiques

1.1 Rapporteur transcriptionnel

1.1.1 Fusion transcriptionnelle

1.1.1.1 Description de la technique

La fusion transcriptionnelle est un outil puissant pour étudier la régulation des gènes. Dans cette méthode, le promoteur est fusionné à la séquence codante d'un autre gène qui code pour une protéine facilement détectable, souvent fluorescente (Casadaban, 1976; Ma, 2018). Le niveau de transcription du gène rapporteur, et par conséquent la quantité de protéine, est contrôlé par le promoteur du gène de fusion. Ainsi, les fusions transcriptionnelles peuvent faciliter l'analyse de la régulation des gènes dont les produits protéiques codés naturellement ne sont pas facilement quantifiables. Cette technique permet de mesurer l'expression des gènes dans les cellules vivantes en temps réel car elle est non invasive et non destructive. Elle permet d'analyser un grand nombre de conditions différentes rapidement et à faible coût.

1.1.1.2 Gènes rapporteurs utilisés

La protéine mCherry, constitutivement fluorescente dans le rouge et dérivée de *Discosompa sp.*, a été publiée en 2004 et a déjà été largement utilisée pour des fusions transcriptionnelles (García-Cayuela *et al.*, 2012; Mohedano *et al.*, 2015). Son temps de demi-vie dans une bactérie a été évalué entre 24 et 48 heures (Garay-Novillo *et al.*, 2019), ce qui en fait un candidat idéal pour des études en temps réel d'une croissance bactérienne de 24 heures. Sa luminosité est établie à environ $15 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ selon la base de données des protéines fluorescentes FPbase (<https://www.fpbases.org/>). La luminosité d'une protéine est calculée comme le produit du coefficient d'extinction et du rendement quantique. Le coefficient d'extinction molaire ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) est une mesure de la force avec laquelle la protéine absorbe la lumière à une longueur d'onde donnée. Le rendement quantique représente le rapport entre les photons émis et les photons absorbés. C'est la probabilité qu'une fois excitée par un photon, la protéine émette un photon. La luminosité dépend de caractéristiques supplémentaires de la protéine telles que l'efficacité de repliement et le pKa. La protéine YPet, constitutivement fluorescente jaune, est dérivée de l'*Aequorea victoria* (Nguyen and Daugherty, 2005; Yoon *et al.*, 2013). La luminosité moléculaire de cette dernière est d'environ 80, ce qui la rend meilleure que mCherry. Ces deux protéines ont également l'avantage de ne pas chevaucher le spectre d'absorption ou d'émission de fluorescence de la PVDI, qui est produite par nos souches et qui est naturellement fluorescente dans le jaune.

1.1.2 Construction de mutants

Les mutants sont construits à partir de la souche PAO1 (souche de référence de *P. aeruginosa* isolée en 1954 sur une plaie infectée à Melbourne en Australie). La souche *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) a été utilisée comme souche hôte pour les plasmides. Les fragments d'ADN de *P. aeruginosa* pour le clonage ont été amplifiés à partir de l'ADN génomique de la souche PAO1 avec l'ADN polymérase Phusion High-Fidelity (Thermo-Fisher Scientific). L'insertion de la séquence a été réalisée à l'aide d'un plasmide PEXG2 (Rietsch *et al.*, 2005) dans la région intergénique entre *glmS* et *PA5548*, n'affectant pas le métabolisme de *P. aeruginosa* (Choi *et al.*, 2005). La construction des plasmides a été réalisée avec le NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix. Les clones recombinants ont été isolés puis vérifiés par PCR et séquençage Sanger. Les différents mutants ainsi construits sont répertoriés dans le Tableau 5.

Nom de la souche	Gène rapporté	Rapporteur	N° collection
prom <i>pfeA</i> -mCherry	<i>pfeA</i>	mCherry	1111
prom <i>foxA</i> -mCherry	<i>foxA</i>	mCherry	1112
prom <i>fptA</i> -YPet	<i>fptA</i>	YPet	1114
prom <i>fpvA</i> -YPet	<i>fpvA</i>	YPet	1115

Tableau 5 : Souches mutantes construites par fusion transcriptionnelle.

1.2 Milieux et conditions de culture

1.2.1 Milieux de culture

Les bactéries sont décongelées et mises en culture dans le milieu *Lysogeny Broth* (LB). Il contient 20 g/L de LB Broth Lennox (Euromedex) solubilisés dans de l'eau déminéralisée. Ce milieu peut aussi être utilisé sous forme solide (LB Lennox agar, Euromedex) pour la conception de boîtes de culture en l'utilisant à 35 g/L. Ce milieu est riche en fer, avec une concentration de 5 µM (Cunrath *et al.*, 2016).

Le milieu *casamino acid* (CAA) est utilisé pour une culture des bactéries dans un environnement liquide carencé en fer. Il contient 5 g/L de *bacto casamino acid* (Gibco), 1,46 g/L de K₂HPO₄, 0,25 g/L de MgSO₄, le tout solubilisé dans de l'eau déminéralisée. La concentration en fer de ce milieu est de 20 nM (Cunrath *et al.*, 2016).

1.2.2 Conditions de culture

Lors de la préparation d'une culture de *P. aeruginosa*, 5 mL de milieu LB sont ensemencés dans un tube à partir du stock conservé à -80°C dans du LB avec du glycérol à 20 %. Le tube de culture est incubé

pendant 24 heures à 30°C avec une agitation de 220 rpm. Après cette incubation, la culture est lavée, puis resuspendue dans 10 mL de CAA frais. Le tube est alors replacé dans l'incubateur à 30°C avec agitation à 220 rpm pour la nuit. La culture est prête à être utilisée le lendemain matin.

1.2.3 Surnageants de culture

1.2.3.1 Souches utilisées

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Glutamicibacter arilaitensis* utilisées dans cette étude ont été généreusement fournies par Dr. Olivier Cunrath et sont résumées dans le Tableau 6.

Nom complet de la souche	Abréviation	Caractéristiques
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Wild Type	<i>Kp</i> WT	Souche WT produisant et sécrétant de l'ENT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Δ entC	<i>Kp</i> Δ entC	Souche mutante ne produisant pas d'ENT
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>	<i>Ga</i>	Souche WT produisant et sécrétant de la NOCA

Tableau 6 : Souches utilisées pour les expériences avec surnageants de culture.

1.2.3.2 Cultures de *Kp* et *Ga* et récupération des surnageants

Les souches *Kp* et *Ga* ont été décongelées et mises en culture dans un milieu LB pendant 24 heures avec une agitation de 220 rpm à 37°C pour *Kp* et à 30°C pour *Ga*, puis, après lavage, les bactéries ont été cultivées dans un milieu CAA pendant 24 heures avec une agitation de 220 rpm à 37°C pour *Kp* et à 30°C pour *Ga*. Après centrifugation à 8500 rpm pendant 3 min, les surnageants sont récupérés et peuvent être utilisés en tant que milieu de culture de *P. aeruginosa* en mélange selon les proportions volumiques suivantes : 50 % de surnageant et 50 % de milieu CAA.

1.3 Sidérophores

Pour nos expériences, l'ENT et la DFOB ont été achetées à Sigma-Aldrich et la NOCA et la PROTO ont été purifiées comme décrit précédemment (Meyer and Abdallah, 1978). Les sidérophores sont dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 10 mM.

2 Acquisition et traitement des données

2.1 Analyse de croissance, de production de PVDI et de fluorescence

Les pré-cultures faites en milieu carencé en fer sont lavées avec du CAA puis diluées à une densité optique de 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$) de 0,01. 200 μL de cette solution bactérienne est déposé dans les puits d'une plaque à 96 puits stérile (Greiner U shape). Une concentration croissante d'ENT (0,01 à 100 μM) ou de NOCA (0,01 à 100 μM) est ajoutée aux bactéries. La plaque est incubée à 30°C et agitée toutes les 15 minutes dans un lecteur de microplaques (Infinite® 200 PRO M Nano+, Tecan). Le suivi de croissance (mesure de la $DO_{600\text{ nm}}$), de la production de PVDI (mesure de l'absorbance à 400 nm, $DO_{400\text{ nm}}$) (Budzikiewicz, 2004) et de la fluorescence de la protéine rapportrice se fait par prise de mesures toutes les 30 minutes pendant 24 heures. Dépendant de la protéine rapportrice utilisée, l'excitation et l'émission sont réglées aux longueurs d'onde suivantes : mCherry : excitation à 570 nm et émission à 610 nm, YPet : excitation à 500 nm et émission à 540 nm.

Pour analyser la production de PVDI, les données sont traitées de la manière suivante :

$$\frac{DO_{400\text{ nm}}}{DO_{600\text{ nm}}} \quad (2)$$

Pour vérifier si la différence de fluorescence est significative entre une condition et le témoin, nous utilisons le traitement de données suivant :

$$(Fluorescence_{condition} - Fluorescence_{contrôle})/Fluorescence_{contrôle} \quad (3)$$

Pour chaque condition, les données de fluorescence ont été traitées comme suit : les données de fluorescence du contrôle (sans sidérophore) sont d'abord soustraites à la fluorescence de la condition d'intérêt. Ensuite, pour chaque condition, la fluorescence résultante est divisée par la $DO_{600\text{ nm}}$, notée $Absorbance_{condition}$, qui représente la densité des bactéries dans l'échantillon (4). Le résultat peut être assimilé au signal de fluorescence émis par une seule bactérie.

$$(Fluorescence_{condition} - Fluorescence_{contrôle})/Absorbance_{condition} \quad (4)$$

2.2 PCR en temps réel

La transcription de gènes spécifiques est mesurée par réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR) quantitative en temps réel (Real Time quantitative PCR, RT-qPCR). Les pré-cultures faites en milieu carencé en fer sont lavées avec du CAA puis diluées à une $DO_{600\text{ nm}}$ de

0,1. Les cellules sont ensuite cultivées avec ou sans sidérophore (ENT : 0,001 à 10 μM , NOCA : 0,1 à 100 μM), sous agitation à 220 rpm, à 30 °C pendant 8 h. Ensuite, $2,5 \times 10^8$ cellules sont mélangées à deux volumes de RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen). Les échantillons sont lysés dans du Tris-EDTA à pH 8,0 contenant 15 mg mL⁻¹ de lysozyme (Sigma-Aldrich) pendant 15 minutes à 25 °C. Puis, l'ARN total est extrait à l'aide de RNeasy MinElute Spin Columns et de gDNA Eliminator Spin Columns du RNeasy Plus Micro Kit (Quiagen). Un traitement par DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen) est réalisé pour chaque échantillon. La rétro-transcription de l'ARN est faite à l'aide du kit de synthèse d'ADNc iScript™ (Bio-Rad) avec 1 μg d'ARN initial. L'expression des gènes est mesurée avec un instrument de PCR en temps réel CFX Opus 96 (Bio-Rad) en utilisant le supermix iTaq Universal SYBR Green (Bio-Rad) et les amorces appropriées conçues sur l'application en ligne Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/>). *rpoD*, *clpX*, *rpsL*, *proC* et *uvrD* ont été testés en tant que gènes de référence à l'aide de l'outil de sélection des gènes de référence basé sur GeNorm du logiciel CFX Maestro™ (Bio-Rad). *rpoD* code pour un facteur σ responsable de la transcription des gènes de ménage, *clpX* code pour la sous-unité de liaison à l'ATP de la protéase Clp de la famille des protéines chaperons de choc thermique, *rpsL* code pour la protéine S12 de la sous-unité 30S du ribosome, *proC* code pour une pyrroline-5-carboxylate réductase impliquée dans la biosynthèse de la proline et *uvrD* code pour une hélicase impliquée dans la réparation des erreurs d'appariement. Ces gènes ont été sélectionnés car ils ont déjà été avérés stables chez *P. aeruginosa* (Ahmed *et al.*, 2019a; Alqarni *et al.*, 2016a; Konings *et al.*, 2013a; Perraud *et al.*, 2020b; Savli *et al.*, 2003a). Dans notre étude, les gènes de référence utilisés sont *rpoD* et *clpX*. Pour l'analyse des données, les cycles de quantification (cycle of quantification, Cq) sont déterminés par régression.

Le ratio de variation (Fold Change) pour chaque gène d'intérêt (Gene Of Interest, *GOI*) et chaque condition est calculé selon l'équation de Pfaffl (Pfaffl, 2001) ajustée à l'utilisation de deux gènes de référence notés *REF1* et *REF2*. Préliminairement, les efficacités d'amplification (*E*) des gènes cibles et de référence sont définies en effectuant des dilutions en série d'un échantillon d'ADNc et de leur analyse par qRT-PCR du gène cible. Les valeurs de Cq sont reportées sur une échelle logarithmique avec les concentrations correspondantes, puis la pente de la ligne de tendance de ces données est calculée par régression linéaire. La valeur de *E* est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{pente}}} - 1 \quad (5)$$

Ensuite, pour chaque gène, les valeurs de ΔCq sont calculées en soustrayant le Cq du contrôle du Cq de la condition étudiée :

$$\Delta Cq = Cq_{\text{contrôle}} - Cq_{\text{condition}} \quad (6)$$

Les valeurs de quantification relative (Relative Quantification, RQ) sont calculées grâce à l'efficacité d'amplification (E) d'un gène et le ΔCq de la façon suivante :

$$RQ = E^{\Delta Cq} \quad (7)$$

Le facteur de normalisation (Normalisation Factor, NF) est calculé par la moyenne géométrique des RQ de $REF1$ et $REF2$:

$$NF = \sqrt{RQ_{REF1} \cdot RQ_{REF2}} \quad (8)$$

Pour calculer le Fold Change du GOI entre la condition et le contrôle, la valeur de RQ du GOI et divisée par NF :

$$Fold\ Change = \frac{RQ_{GOI}}{\sqrt{RQ_{REF1} \cdot RQ_{REF2}}} \quad (9)$$

Pour calculer l'erreur sur le Fold Change du GOI entre la condition et le contrôle, les erreurs standards (Standard Error, SE) des RQ du GOI , de $REF1$ et de $REF2$ sont d'abord calculés par propagation d'incertitude (Daley, 2009; Nordgård *et al.*, 2006) grâce à leur RQ respective, à leur E respective, à l'écart-type (Standard Deviation, SD) des Cq respectif, et au nombre d'échantillons nb (dans notre cas, nous travaillons avec des triplicats biologiques, donc $nb = 3$) :

$$SE_{RQ,k} = \frac{SD_{Cq,k} \cdot RQ_k \cdot \ln(E_k)}{\sqrt{nb}} \quad (10)$$

Pour $k = \{GOI, REF1, REF2\}$.

L'erreur standard du NF (SE_{NF}) est calculé selon :

$$SE_{NF} = \frac{NF}{\sqrt{2}} \cdot \sqrt{\left(\frac{SE_{RQ,REF1}}{RQ_{REF1}}\right)^2 + \left(\frac{SE_{RQ,REF2}}{RQ_{REF2}}\right)^2} \quad (11)$$

L'erreur standard du Fold Change (SE_{FC}) se calcule en utilisant les expressions précédentes de la façon suivante :

$$SE_{FC} = FC \cdot \sqrt{\left(\frac{SE_{NF}}{NF}\right)^2 + \left(\frac{SE_{RQ\ GOI}}{RQ_{GOI}}\right)^2} \quad (12)$$

2.3 Traitement de données

Toute la modélisation mathématique a été réalisée avec Python 3.8 (<https://www.python.org/>) et des paquets (<https://pypi.org/>) : Pandas a été utilisé pour manipuler et gérer les données, NumPy et SciPy ont été utilisés pour traiter les données et créer les modèles, Matplotlib et Seaborn ont été utilisés pour les visualisations. Enfin, PyTorch et SciKitLearn ont été utilisés pour tester des approches de machine learning présentées dans la discussion.

Pour ce qui concerne la modélisation mathématique, la fonction `curve_fit` de SciPy est utilisée afin d'estimer les paramètres des modèles mathématiques permettant de s'ajuster au mieux avec les données expérimentales. L'indicateur de précision utilisé, sauf indication contraire, est l'écart quadratique moyen (*Mean Square Error, MSE*) défini ainsi :

$$MSE = \sum_k (y_k - \hat{y}_k)^2 \quad (13)$$

avec y_k la donnée expérimentale mesurée pour une condition x_k donnée et \hat{y}_k la valeur prédite par le modèle pour une même condition x_k .

Complémentairement à Matplotlib, GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/>) a été utilisé pour visualiser les données. Pour la représentation des résultats de mélange de sidérophores, les graphiques en courbes de niveaux ont été réalisés en utilisant les fonctions `scipy.interpolate.griddata(method='linear')` et `matplotlib.pyplot.contourf`.

3 Modélisation mathématique

3.1 Dynamique de fluorescence

Pour modéliser l'évolution du signal de fluorescence, nous avons établi deux hypothèses. La première est que le signal de fluorescence est directement proportionnel à la concentration du rapporteur fluorescent, soit $F = k \cdot P$ où F est le signal de fluorescence et P la concentration de mCherry ou YPet. La deuxième est que l'évolution temporelle de la concentration du rapporteur fluorescent peut être modélisée par une équation différentielle du premier ordre (14) impliquant une expression constante du gène, et donc un taux de production constant, noté β (en $\mu\text{M}/\text{h}$) du rapporteur, et le taux de dégradation de mCherry ou YPet d (en h^{-1}).

$$\frac{dP}{dt} = \beta - d \cdot P \quad (14)$$

La solution de cette équation différentielle est donnée par l'équation (15). La production de mCherry ou YPet est modélisée à l'aide de l'équation dépendante du temps t définie par $P(t)$:

$$P(t) = P_{\infty} \cdot \left(1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}\right) \quad (15)$$

Les paramètres de cette équation sont :

- P_{∞} , concentration de la protéine à l'équilibre, c'est-à-dire quand sa production est entièrement compensée par sa dégradation,
- τ , temps caractéristique égal à $\frac{1}{d}$ et correspond au temps nécessaire pour atteindre 63 % de P_{∞} ,
- t_0 , délai de latence correspondant au temps entre le moment où l'expérience démarre et le moment où la production du rapporteur fluorescent est détectée. Ce temps s'explique par différents aspects biologiques tels que le temps d'adaptation de la bactérie à son nouvel environnement et les délais introduits par les mécanismes de transcription et de traduction, mais aussi par le seuil de détection de fluorescence de l'appareil de mesure.

La Figure 56 représente une courbe tracée avec l'équation (15) et ses paramètres. La grandeur d'intérêt est, pour notre application, la valeur β . t_0 permet au modèle de s'ajuster uniquement sur les

valeurs en dehors du bruit de fond. D'après l'équation (15) à l'état d'équilibre, nous pouvons affirmer que :

$$\beta = \frac{P_{\infty}}{\tau} \quad (16)$$

En pratique, le paramètre t_0 est impossible à identifier car le démarrage de la courbe de croissance se fait dans le bruit de fond. Nous considérerons que cette valeur correspond au moment où les mesures sortent en dehors du bruit de fond. Même si elle est grossière, cette hypothèse ne gêne pas l'analyse des données dans la mesure où, dans le cas d'un système du premier ordre comme celui-ci, l'extraction des paramètres d'intérêt, à savoir P_{∞} et τ , peuvent se faire sans connaissance précise de t_0 . La seule condition à respecter est de fixer une valeur de t_0 tel qu'à t_0 le terme de production reste bien supérieur au terme de dégradation et donc que la dérivée $\frac{dP}{dt}$ puisse être assimilée à β .

Ainsi, l'activité du gène peut être déduite de la courbe de fluorescence après avoir ajusté cette fluorescence par l'équation (15) (Figure 56). Pour certaines conditions, en particulier les conditions où la courbe de fluorescence était proche de zéro, l'ajustement de l'équation (15) par le modèle du premier ordre échoue, ce qui conduit à des paramètres aberrants (P_{∞} très élevé et/ou τ très faible). Les données de ces conditions sont supprimées pour la suite de l'analyse. La valeur de β représente la valeur de production de la protéine rapportrice pour la condition donnée. Elle est indépendante du temps et caractérise la condition étudiée.

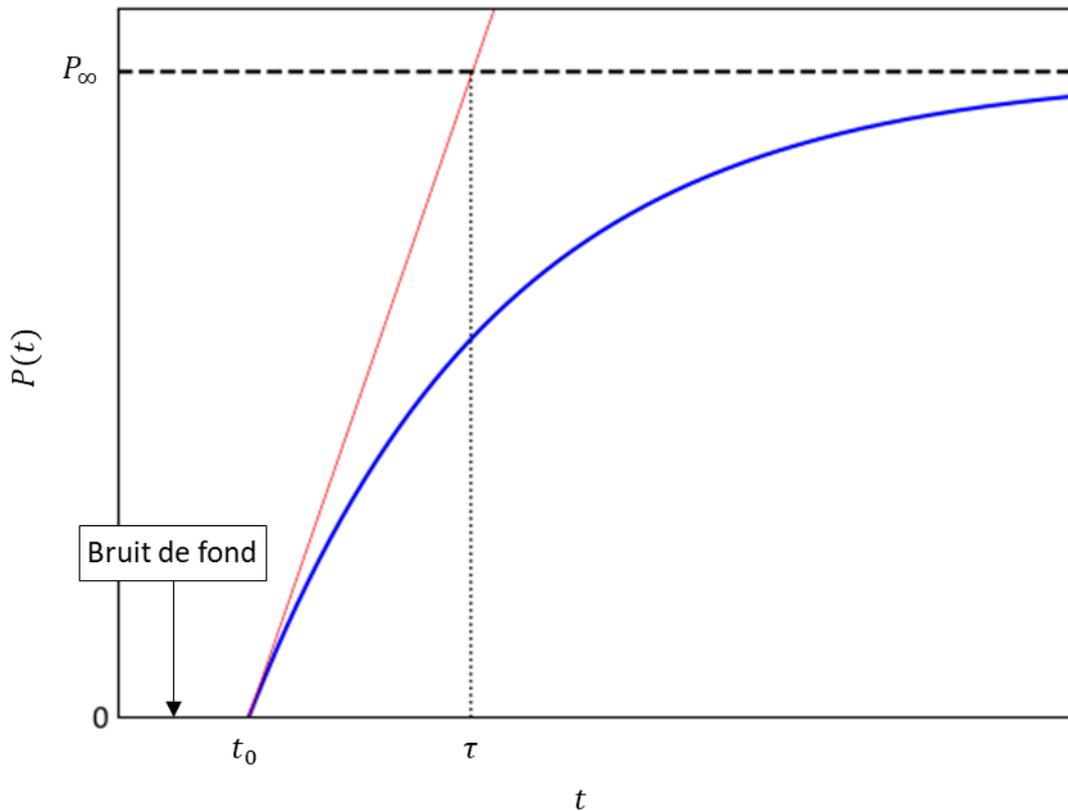


Figure 56 : Équation de production $P(t)$ avec les paramètres : P_∞ , τ et t_0 . La courbe de production d'équation $P(t)$ est représentée en bleu, t_0 en vert et la tangente à $P(t)$ en rouge.

3.2 Modèle de régulation de type « Hill »

L'équation de Hill (Hill, 1910) est un modèle phénoménologique très souvent employé en biologie des systèmes pour décrire des schémas de régulation à deux états (actif et inactif) avec une transition plus ou moins raide entre les deux dont la forme rappelle une sigmoïde (Bottani and Veitia, 2017; Goutelle *et al.*, 2008; Santillán, 2008). Lorsque la transition se fait à partir de l'état inactif à faible concentration de la molécule régulatrice, l'expression nominale de l'équation de Hill, $H(x)$, est donnée par l'équation suivante (Figure 57) :

$$H(x) = y_0 + (y_{max} - y_0) \cdot \frac{x^n}{K^n + x^n} \quad (17)$$

Les paramètres de cette équation sont les suivants :

- y_0 désigne l'expression génétique basale,
- y_{max} désigne l'expression génétique maximale,

- K désigne la concentration de sidérophore nécessaire pour que l'expression génétique soit égale à la moitié de son maximum,
- n , aussi appelé coefficient de Hill, détermine la pente de la courbe à la concentration K .

On retrouve bien le comportement asymptotique attendu : $\lim_{x \rightarrow 0} H(x) = y_0$ et $\lim_{x \rightarrow \infty} H(x) = y_{max}$

Ainsi que le point d'inflexion : $H(K) = \frac{y_{max} - y_0}{2}$

À l'inverse, lorsque la régulation se fait de l'état actif vers l'état inactif, l'équation devient :

$$H'(x) = y_0 + (y_{max} - y_0) \cdot \frac{K^n}{K^n + x^n} \quad (18)$$

Avec les mêmes paramètres que précédemment. Là encore on retrouve le comportement asymptotique $\lim_{x \rightarrow 0} H'(x) = y_{max}$ et $\lim_{x \rightarrow \infty} H'(x) = y_0$ ainsi que la concentration au point d'inflexion $H'(K) = \frac{y_{max} - y_0}{2}$.

L'équation de Hill a été largement utilisée pour modéliser la fonction de régulation des gènes qui suivent de manière générale une tendance sigmoïde, mais il convient d'être prudent dans l'interprétation de la signification biologique de n . Il a été admis que le coefficient de Hill correspondrait au nombre de sites de liaison avec les facteurs de transcription. Comme le coefficient de Hill n'est probablement pas un nombre entier, la détermination du nombre de sites de liaison peut prêter à confusion. La synergie des facteurs de transcription peut légèrement augmenter la valeur. De plus, le coefficient de Hill ne permet pas de distinguer les mécanismes compétitifs, non compétitifs ou ortho-, iso- ou allostériques (Prinz, 2009). Dans nos travaux, le coefficient de Hill sera uniquement utilisé pour caractériser les données et permettre de comparer une courbe à une autre. Aucune hypothèse sur le nombre et la nature des sites de liaison des facteurs de transcription dans les séquences promotrices ne sera faite.

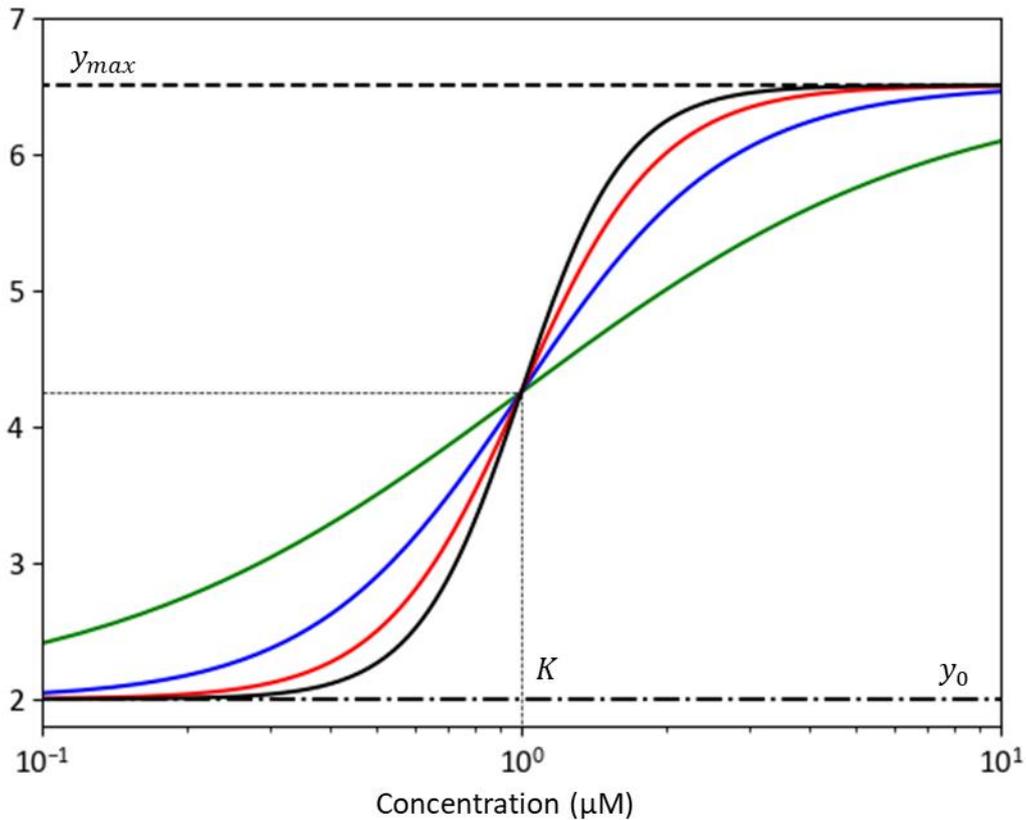


Figure 57 : Exemple d'équations de Hill $H(x)$ avec comme paramètres fixes : $y_0 = 2$, $y_{max} = 6,5$, $K = 1$. En vert est représentée la courbe de Hill avec $n = 1$, en bleu avec $n = 2$, en rouge avec $n = 3$ et en noir avec $n = 4$. L'axe des abscisses correspond à la concentration en sidérophore et est en échelle logarithmique de base 10.

3.3 Modèle de régulation de type « Logarithmique »

L'équation linéaire par morceaux dans le domaine logarithmique $L(x)$ (19) est utilisée pour caractériser un jeu de données comprenant un premier ensemble de valeurs nulles jusqu'à une certaine concentration x_E , puis linéaire en fonction du logarithme de la concentration $\log_{10}(x)$ (Figure 58).

$$L(x) = \begin{cases} 0, & x < x_E \\ a \cdot \log_{10}\left(\frac{x}{x_E}\right), & x \geq x_E \end{cases} \quad (19)$$

Où :

- x_E est la valeur x à partir de laquelle le comportement logarithmique commence à être observé.
- a est le coefficient directeur de la droite d'équation $a \cdot \log_{10}\left(\frac{x}{x_E}\right)$.

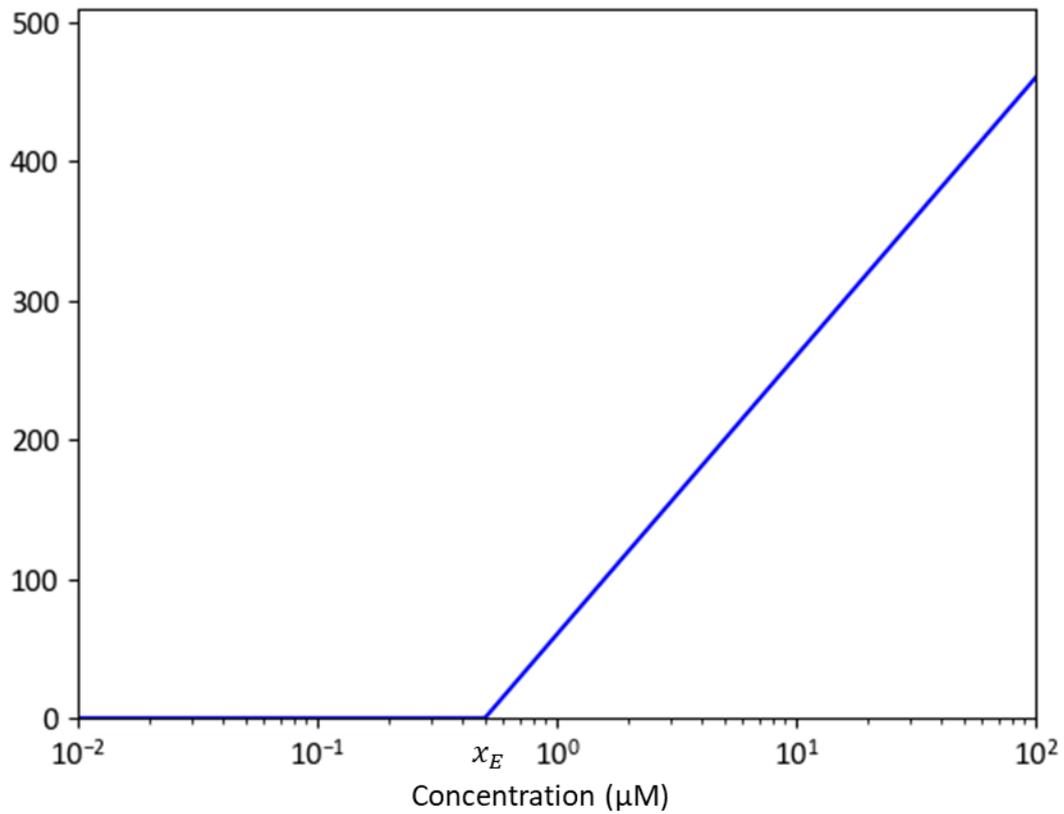


Figure 58 : Exemple d'équation $L(x)$ avec comme paramètres : $a = 200$ et $x_E = 0.5$. La courbe d'équation $L(x)$ est représentée en bleu. L'axe des abscisses correspond à la concentration en sidérophore et est en échelle logarithmique de base 10.

3.4 Méthode de comparaison entre jeux de données

3.4.1 Normalisation

La comparaison de deux expressions génétiques modélisées par des équations de Hill repose principalement sur les valeurs respectives de n et K obtenues après avoir ajusté les résultats expérimentaux par des courbes de Hill. Lorsque deux jeux de données n'ont pas la même échelle, que ce soit parce qu'ils ont été obtenus avec des techniques de mesures différentes ou parce qu'ils ont des valeurs basales et maximales de production différentes, nous normalisons dans un premier temps les données avant de comparer les résultats. Soient :

$$H_A(x) = y_{0,A} + (y_{\max,A} - y_{0,A}) \cdot \frac{x_A^n}{K_A^n + x_A^n} \quad (20)$$

Et :

$$H_B(x) = y_{0,B} + (y_{\max,B} - y_{0,B}) \cdot \frac{x_B^n}{K_B^n + x_B^n} \quad (21)$$

Sont respectivement les ajustements par une équation de Hill des jeux de données A et B. Pour évaluer si le n et le K sont équivalents pour les deux jeux de données, nous normalisons dans un premier temps les deux jeux de données entre 0 et 1 et ajustons par une équation de Hill pour laquelle $y_0 = 0$ et $y_{\max} = 1$:

$$\frac{H_A(x) - y_{0,A}}{y_{\max,A} - y_{0,A}} = \frac{x_A^n}{K_A^n + x_A^n} \quad (22)$$

Et

$$\frac{H_B(x) - y_{0,B}}{y_{\max,B} - y_{0,B}} = \frac{x_B^n}{K_B^n + x_B^n} \quad (23)$$

Pour comparer deux jeux de données suivant une équation $L(x)$, nous pouvons procéder de manière similaire sur la partie où $x \geq x_E$ en normalisant les données entre 0 et 1, et évaluer si les x_E sont équivalents.

3.4.2 Comparaison des données et modélisation commune

Une fois les jeux de données normalisés, une méthode de comparaison consiste à les assembler en un seul jeu. À partir de ce nouvel ensemble, un modèle commun moyen aux deux jeux initiaux peut être établi et comparé. Pour se faire, nous pouvons calculer la racine de l'écart quadratique moyen (*Root Mean Square Error*, RMSE) qui donnera une valeur de précision entre chaque jeu de données et le nouvel ensemble. Cette valeur de RMSE pourra ensuite être comparée à la valeur de l'erreur standard de chaque jeu de données, qui correspond à l'erreur intrinsèque de l'expérimentation. Si la valeur de RMSE est plus faible ou équivalente à la valeur de l'erreur standard de chaque jeu de données, alors ce nouveau modèle commun peut être assimilé à celui des jeux de données initiaux. On peut alors affirmer que les données des différents jeux suivent un modèle commun avec une erreur raisonnable.

Prenons deux jeux de données normalisés et modélisés A et B, assemblons-les en un nouvel ensemble C. Nous connaissons l'erreur standard de A et de B. Nous allons calculer la valeur de RMSE entre A et C et entre B et C, puis nous allons comparer ces valeurs aux erreurs standards respectives. Si les RMSE

sont inférieurs ou équivalents aux erreurs standards, alors nous pouvons affirmer que les jeux A et B sont modélisables par le modèle de C avec une erreur égale à la valeur de la RMSE. Nous pouvons conclure que les données de A et B suivent la même tendance et nous avons caractérisé cette tendance par le modèle C et son erreur (Figure 59).

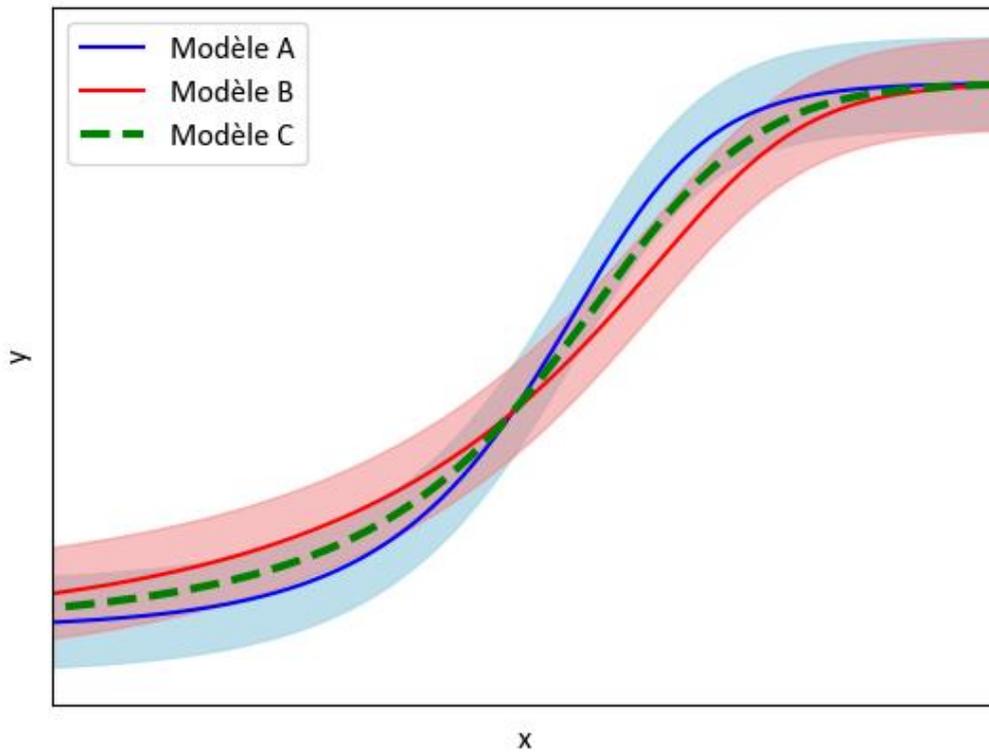


Figure 59 : Exemple de comparaison de jeux de données normalisés. Le jeu de données A a été modélisé par une équation de Hill en bleu et le jeu de données B en rouge avec leurs zones d'erreur respectives. Ces deux jeux de données ont été assemblés en un jeu de données C qui a été modélisé par la courbe en tirets verts. Ici, le modèle de C passe par l'intersection des erreurs de A et B. Nous pouvons conclure que A et B peuvent être modélisés par l'équation du modèle de C.

PARTIE III :

RÉSULTATS

Chapitre I :

Approches expérimentales de
protéomique et qRT-PCR pour étudier
l'expression des voies d'acquisition du fer
chez *P. aeruginosa*

Pour étudier l'expression des voies d'import du fer chez *P. aeruginosa*, nous souhaitons suivre et modéliser les variations au niveau de la transcription et de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans ces voies. Ces voies sont très différentes les unes des autres et impliquent un nombre variable de protéines et des mécanismes moléculaires qui peuvent être eux aussi très différents. Mais, toutes les voies d'import du fer, exceptée celle important du fer ferreux, impliquent au moins un TBDT pour l'import du fer ou de l'hème au travers de la membrane externe. Par ailleurs, tous les gènes codant pour des protéines impliquées dans une même voie d'assimilation du fer sont tous localisés au niveau d'un même locus. Par conséquent, suivre les variations de transcription ou d'expression des TBDT est assez représentatif de tous les gènes d'une voie, et permet de comparer dans une certaine mesure la variation d'expression des différentes voies.

Ces dernières années, au laboratoire, l'adaptation phénotypique de *P. aeruginosa* concernant l'expression de ses différentes voies d'import du fer a été étudiée en cultivant *P. aeruginosa* en présence de différents exosidérophores à une concentration de 10 μM (Gasser *et al.*, 2016; Normant *et al.*, 2020; Perraud *et al.*, 2020b) ou en présence de 0,25 μM d'hème (Normant *et al.*, 2022). Ces expériences ont été analysées par une approche de protéomique différentielle (Figure 60) et/ou de qRT-PCR. *P. aeruginosa* PAO1 a été cultivé en général pendant 8 h dans un milieu carencé en fer et en présence d'un exosidérophore à 10 μM ou non (condition témoin). Pour l'approche protéomique, les protéines sont extraites puis digérées en peptides. Les peptides sont ensuite séparés par chromatographie liquide (*Liquid Chromatography*, LC) puis analysés par spectrométrie de masse pour identifier les protéines présentes dans chaque échantillon. Des bases de données protéiques sont utilisées pour faire correspondre les spectres de masse aux séquences protéiques connues. Les différences de quantité de protéines entre les échantillons sont évaluées en utilisant la spectrométrie de masse en tandem (*tandem Mass Spectrometry*, MS/MS). Les données de protéomique différentielle sont traitées statistiquement pour identifier les protéines dont les niveaux d'expression diffèrent de manière significative entre les échantillons.

Cette méthode a permis de visualiser l'ensemble des protéines dont l'expression varie pour chaque sidérophore étudié. En examinant les signatures protéomiques associées à chaque condition expérimentale, nous pouvons identifier les protéines qui sont différemment exprimées et qui jouent un rôle clé dans l'acquisition du fer par le sidérophore testé et dans l'adaptation phénotypique de *P. aeruginosa*. Cette approche nous offre une vision globale des réponses adaptatives de *P. aeruginosa* en présence de divers sidérophores.

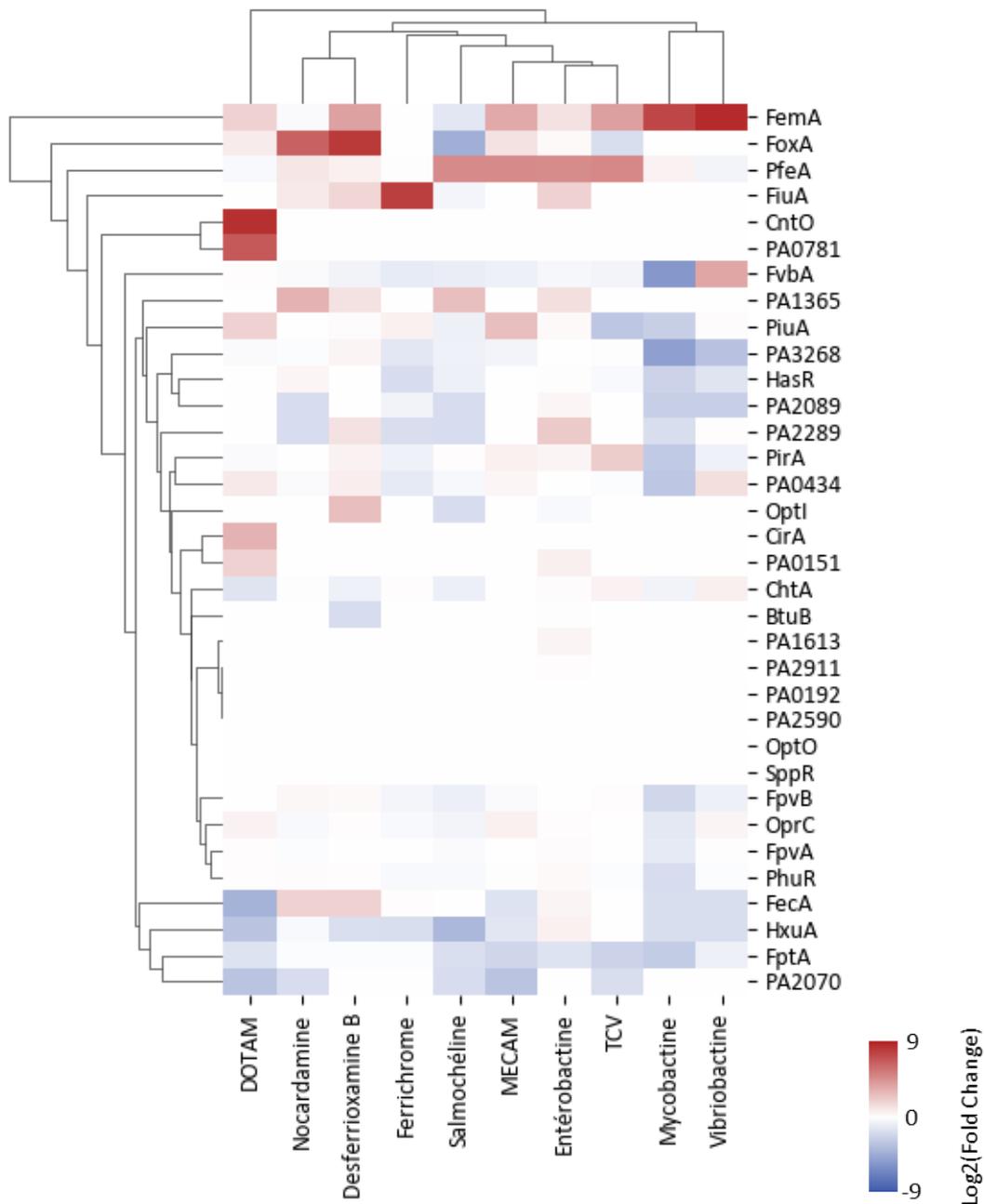


Figure 60 : Clustermap de l'expression des TBDT présents dans le génome de *P. aeruginosa* par analyses protéomiques. Les données ont été obtenues au laboratoire. *P. aeruginosa* PAO1 a été cultivée dans un milieu carencé en fer, les données de protéomique différentielle sont issues de la comparaison entre la condition avec un exosidérophore à 10 μ M et la condition témoin sans exosidérophore. Les données ont été analysées sous forme de Fold Change en logarithme de base 2. La clustermap a été réalisée avec la fonction clustermap du package seaborn sur Python.

La qRT-PCR est une méthode basée sur la quantification relative de mRNA entre deux conditions, dans notre cas les conditions sont la présence et l'absence d'un sidérophore dans le milieu de culture. Elle permet de quantifier précisément les niveaux de transcription des gènes associés aux voies d'import

du fer. L'ARN total de l'échantillon biologique d'intérêt est d'abord extrait, puis l'ADN complémentaire (*complementary DNA*, cDNA) est synthétisé en utilisant une transcriptase inverse (*reverse transcriptase*, RT). Le mélange de PCR contient le cDNA, des amorces spécifiques qui amplifient le gène d'intérêt, des nucléotides, une ADN polymérase ainsi que du SYBR Green, une molécule qui fluoresce une fois liée à de l'ADN double brin. Pendant la réaction de PCR, les amorces spécifiques se lient aux régions complémentaires du cDNA et l'ADN polymérase synthétise de nouveaux brins d'ADN liés au SYBR Green. La quantité de fluorescence émise par le SYBR Green est proportionnelle à la quantité cumulée de brins d'ADN néoformés présents dans l'échantillon. Les données de fluorescence sont recueillies à chaque cycle de PCR et le nombre de cycles de PCR nécessaires à la détection de la fluorescence du SYBR Green dans les échantillons par l'appareil (Cq) est déterminé. En normalisant ces données par les Cq de gènes de référence qui ont une expression stable dans toutes les conditions, il est possible de calculer la différence de quantités initiales d'ARN dans les échantillons d'origine sous la forme d'un Fold Change. En comparant ces niveaux de transcription dans différentes conditions expérimentales, il est possible d'identifier les facteurs environnementaux ou les signaux qui influencent la transcription des gènes. Les approches de protéomique et de qRT-PCR ont été utilisées au laboratoire pour leur complémentarité et leur efficacité. L'expression des transporteurs de sidérophores peut être étudiée de manière précise et quantitative aux niveaux transcriptionnel et traductionnel, offrant ainsi des informations détaillées sur la régulation des voies d'acquisition du fer de *P. aeruginosa*.

Nous avons opté pour une méthode alternative à la qRT-PCR et à la protéomique afin de suivre l'expression des TBDT. Bien que ces deux approches fournissent des résultats robustes, leur mise en œuvre nécessite des protocoles complexes et coûteux. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser la technique des rapporteurs fluorescents. Cette approche nous permet d'explorer un large éventail de conditions de manière plus efficace et économique, afin de mieux caractériser l'expression des TBDT et par conséquent, des voies d'import du fer.

Chapitre II :

Méthodes expérimentales et informatiques pour étudier les variations comportementales de l'expression des TBDT en réponse à la concentration de sidérophores chez *P. aeruginosa*.

Résumé de l'article

Nous avons construit des rapporteurs fluorescents pour suivre l'expression génétique des TBDT. Nous avons intégré dans le génome de *P. aeruginosa* la région promotrice d'un gène codant pour un TBDT suivie de la séquence génétique codant pour mCherry, une protéine fluorescente qui sert de rapporteur. Le niveau de transcription du gène rapporteur est contrôlé par la séquence promotrice du gène codant pour le TBDT d'intérêt. La fluorescence de mCherry dans ces constructions permettra de suivre et quantifier l'expression du TBDT d'intérêt, et permet de générer rapidement et de manière économique des données sur l'expression des TBDT.

Nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes *pfeA* et *foxA* chez *P. aeruginosa* et nous avons construit les souches rapportrices fluorescentes, appelées *prompfeA-mCherry* et *promfoxA-mCherry*. PfeA importe le fer *via* l'ENT, un sidérophore de type tricatéchol produit par *E. coli* et *S. typhimurium* (Gasser *et al.*, 2016; Moynié *et al.*, 2019) et utilisé par *P. aeruginosa*. L'ENT est le sidérophore présentant la plus grande affinité connue pour le fer ferrique ($K_a = 10^{49} \text{ M}^{-1}$) (Loomis and Raymond, 1991). FoxA transporte le fer complexé à des sidérophores hydroxamates tels que la NOCA, une molécule trihydroxamate cyclique également connue sous le nom de desferrioxamine E, produite par *Streptomyces wadayamensis* ou *Streptomyces parvulus* (Josts *et al.*, 2019; Normant *et al.*, 2020). L'affinité de ce sidérophore pour le fer ferrique ($K_a = 10^{32} \text{ M}^{-1}$) est plus faible que celle de l'ENT (Anderegg *et al.*, 1963).

Pour chaque construction *prompfeA-mCherry* et *promfoxA-mCherry*, nous avons vérifié par qRT-PCR que les expressions des gènes voisins du site d'insertion ne sont pas modifiées, et que l'ajout d'un second promoteur dans le génome ne modifie pas l'activité du promoteur natif. Le point important que nous avons également vérifié, est que l'expression génétique de mCherry suit bien l'expression génétique du gène qu'elle rapporte et que la fluorescence émise par nos deux souches rapportrices est représentative de l'expression de PfeA ou FoxA.

Les deux souches rapportrices ont été cultivées en plaques 96-puits, en absence et en présence de concentrations croissantes d'ENT ou NOCA. La croissance bactérienne a été suivie tout au long de la culture en mesurant l'absorbance à 600 nm, et l'expression des deux TBDT en mesurant la fluorescence de mCherry. Pour certaines concentrations, nous avons également suivi la transcription des gènes *pfeA*, *foxA* et *mCherry* par qRT-PCR. Pour chaque condition, le signal de fluorescence a été modélisé à l'aide d'une équation mathématique qui permet de déterminer le taux de production de mCherry, appelé β . Les valeurs de β présentent des variations similaires à l'expression génétique de *pfeA* et *foxA*

en fonction de la concentration spécifique du sidérophore. Les données β de *prompfeA*-mCherry ont été modélisées à l'aide d'une équation de Hill et celles de *promfoxA*-mCherry avec une équation logarithmique. Une analyse similaire a été faite avec les données de qRT-PCR.

Les modèles obtenus à partir des données de qRT-PCR et de l'analyse de fluorescence ont été normalisés afin de faciliter leur comparaison. À partir des données normalisées, un modèle commun a été établi pour chaque gène, en combinant les données issues de la qRT-PCR et de la fluorescence. Ces modèles caractérisent la transcription et l'expression de *PfeA* et *FoxA* en fonction de la concentration respectivement en ENT et NOCA.

La modélisation mathématique des données obtenues a montré que la transcription et l'expression des gènes codant pour *PfeA* et *FoxA* ne répondent pas de la même manière et avec la même efficacité à la présence de concentrations croissantes de leurs sidérophores correspondants. Pour *pfeA*, le maximum de transcription a été atteint en présence de 3 μM d'ENT, alors que dans le cas de *foxA*, le maximum n'a pas été atteint avec 100 μM de NOCA. Cette différence peut s'expliquer par le fait que pour les deux voies d'import du fer, les systèmes et les mécanismes de régulation transcriptionnelle des gènes impliqués sont différents et très complexes, impliquant différentes interactions protéiques et des interactions également différentes entre les protéines et les complexes sidérophore-Fe.

Les approches expérimentales et de modélisation utilisées dans cette étude permettent de quantifier et prédire l'expression de *pfeA* et *foxA* chez *P. aeruginosa* en fonction de la concentration d'ENT et de NOCA respectivement. Nous avons démontré l'efficacité des souches rapporteuses fluorescentes en tant qu'outils prometteurs pour suivre en temps réel la transcription et l'expression de *pfeA* et *foxA* pendant toute la croissance bactérienne et en présence d'un large éventail de concentrations de sidérophores.

L'article suivant a été soumis au journal *Scientific Reports* (<https://www.nature.com/srep/>) le 25/07/2023.

Experimental and computational methods to highlight behavioural variations in TonB-dependent transporter expression in *Pseudomonas aeruginosa* versus siderophore concentration

Thibaut Hubert^{1,2,3}, Morgan Madec^{3*}, Isabelle J. Schalk^{1,2*}

¹ CNRS, University of Strasbourg, UMR7242, UMR7242, ESBS, Bld Sébastien Brant, F-67412 Illkirch, Strasbourg, France

² University of Strasbourg, UMR7242, ESBS, Bld Sébastien Brant, F-67412 Illkirch, Strasbourg, France

³ ICube Laboratory, UMR 7357 (CNRS / University of Strasbourg), Bld Sébastien Brant, F-67412 Illkirch, Strasbourg, France

*Corresponding authors: isabelle.schalk@unistra.fr and morgan.madec@unistra.fr

Abstract

Iron is a key nutrient for bacterial growth. The source can be either heme or siderophore-Fe complexes. Siderophores are small molecules synthesized by bacteria to scavenge iron from the bacterial environment. The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* can express at least 15 different iron uptake pathways and all but one involve a TonB-dependent transporter (TBDT) for the uptake of iron across the outer membrane. Little is known about how bacteria modulate and adapt the expression of their different iron import pathways according to their environment. Here, we have developed fluorescent reporters between the promoter region of genes encoding a TBDT and the fluorescent reporter mCherry. With these constructs, we can follow the expression of TBDTs under different growth conditions. Mathematical modelling of the data obtained showed the transcription and expression of the gene encoding the TBDT PfeA to have a sigmoidal shape, whereas it was logarithmic for the TBDT gene *foxA*. Maximum transcription for *pfeA* was reached in the presence of 3 μM enterobactin, the siderophore recognized by PfeA, whereas the maximum was not reached for *foxA* with 100 μM nocardamine, the siderophore of FoxA.

Introduction

Iron is a key nutrient for almost all microorganisms. It is required for bacterial metabolism, growth, and survival.¹⁻⁴ Paradoxically, this essential nutrient shows extremely low solubility ($K_{sp} = 10^{-18}$ M) under aerobic conditions and at neutral pH, which severely limits its bioavailability.⁵ Consequently, iron limitation is a state that microorganisms very often experience and in many ecosystems, the low availability of iron generates fierce competition between them. To overcome iron restriction, many microorganisms synthesize and secrete siderophores, low molecular weight ligands that have a very high affinity for ferric iron (Fe^{3+}).⁶ The biological function of siderophores is to scavenge iron in the environment of bacteria and bring it into the bacterial cell. In Gram-negative bacteria, the uptake of ferri-siderophore complexes across the outer membrane involves TonB-dependent transporters (TBDT).⁷ The energy necessary for the uptake process of ferri-siderophores by these transporters is provided by the inner membrane proton motive force via the inner membrane protein TonB.⁸⁻¹³ TonB forms a molecular motor with two other membrane proteins, ExbB and ExbD, that are able to transfer the energy generated by the proton motive force to the TBDT located in the outer membrane. Many X-ray structures of TBDTs have been published.^{7,14-16} All are composed of a β -barrel of 22 β -strands interacting with the lipids of the outer membrane and contain very large extracellular loops. The lumen of the barrel is filled by a globular domain called the plug. The N-terminal end of the transporter is periplasmic and contains a 5 to 8 amino acid conserved domain called the TonB box, which is essential for interaction with the TonB protein.^{8,17-19} All TBDTs have a binding site localized on the plug composed of residues of the plug and the extracellular loops.⁷ After binding of the ferri-siderophore complex to its binding site on the plug domain, the TonB box of the TBDT interacts with the periplasmic part of the TonB protein to obtain formation of a channel in the transporter and the uptake of ferri-siderophore complexes through the outer membrane.^{8,12,13,17-19} Ferri-enterobactin TBDTs, PfeA in *Pseudomonas aeruginosa* and FepA in *Escherichia coli*, have an additional binding site for ferri-

siderophore complexes localized in the extracellular loops of the barrel.^{15,20} In this case, ferri-enterobactin likely first binds to this binding site before migrating to the binding site on the plug domain.

P. aeruginosa is a ubiquitous microorganism known for its high adaptability to a large range of environmental conditions. It is also an opportunist human pathogen, exhibiting high intrinsic resistance to a broad spectrum of antibiotics. To access iron, *P. aeruginosa* produces two siderophores, pyoverdine and pyochelin, but is also able to use siderophores from other microorganisms in a piracy strategy.²¹ The genome of *P. aeruginosa* encodes 35 TBDTs and at least 20 are dedicated to iron import, three for zinc, one for copper, and one for vitamin B12.^{21,22} The transcription and expression of the genes encoding TBDTs involved in iron acquisition are all regulated by the bacterial intracellular iron concentration. When iron in the cytoplasm of *P. aeruginosa* cells reaches a threshold concentration, iron binds to the transcriptional regulator Fur and the complex formed represses the transcription of all genes encoding proteins involved in iron homeostasis, including those for TBDTs.^{23–26} Transcription of some genes encoding TBDTs are also positively regulated, involving sigma ECF/anti-sigma ECF factors, two-component systems, or AraC-like transcriptional regulators.^{27–32} These three different systems can detect the ability of *P. aeruginosa* to scavenge and import specific ferric-siderophore complexes present in its environment and activate transcription of the gene encoding the TBDT able to import the ferri-siderophore detected. This results in an increase in the expression of the TBDT of the ferri-siderophore complex present in the bacterial environment to increase the efficiency of its uptake.^{33–37} This often goes hand in hand with repression of the transcription of *fptA*, the gene encoding the TBDT of ferric-pyochelin (one of the two siderophores produced by *P. aeruginosa*).

Until now, the regulation of transcription and expression of genes encoding TBDTs has been investigated only in the presence of its ligand at one or a few concentrations and at a given time of culture, i.e., stopping the culture and analyzing the levels of transcription or expression using techniques such as RT-qPCR or proteomics.^{30,33–37} How the transcription of such genes changes and varies during bacterial growth and in the presence of different concentrations of siderophores is not

precisely known. Here, we aimed to monitor and model the changes in transcription and expression of TBDTs involved in the acquisition of iron across concentration gradients of siderophores. Accordingly, we investigated the transcription of two genes encoding TBDTs, *pfeA* and *foxA*, throughout the duration of bacterial culture and in the presence of a wide range of concentrations of siderophores. PfeA imports iron via the tricatechol-type siderophore enterobactin (ENT, Figure S1A), a molecule produced by *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*^{15,33}. Through its three catecholate functions connected to a triserine macrocycle, ENT is the siderophore with the highest known affinity for ferric iron ($K_a = 10^{49} \text{ M}^{-1}$).³⁸ FoxA transports iron complexed to hydroxamate siderophores such as nocardamine (NOCA, Figure S1B, produced by *Streptomyces wadayamensis* or *Streptomyces parvulus*), a cyclic trihydroxamate molecule also known as desferrioxamine E.^{16,35} The affinity for ferric iron of this siderophore is weaker than that of ENT ($K_a = 10^{32} \text{ M}^{-1}$).³⁹ The X-ray structures of these two TBDTs are known and data are available concerning how ferri-ENT and ferri-NOCA interact with their respective binding sites on PfeA and FoxA.^{15,16} We followed the expression of these two TBDTs using promoter fusions: the promoter region of one of these two genes was fused to the coding sequence of the fluorescent protein mCherry, used as reporter,⁴⁰ and inserted into the genome of *P. aeruginosa* to have a fluorescent reporter strain for each TBDT. We show these fluorescent reporter strains to be promising tools that make it possible to follow the real-time transcription and expression of *pfeA* and *foxA* by fluorescence throughout bacterial growth and in the presence of a wide range of siderophore concentrations. Surprisingly, we did not observe maximum transcription and expression at the same concentrations of siderophores for the two genes. Mathematical modeling was used to precisely characterize the expression levels of these two genes as a function of time and siderophore concentration.

Results

Construction of the fluorescent reporter strains *prompfeA-mCherry* and *promfoxA-mCherry* to follow and investigate *PfeA* and *FoxA* expression. We chose to use the TBDTs *PfeA* and *FoxA*, involved in iron acquisition by ENT and NOCA, respectively,^{15,16} to create a mathematical model of TBDT expression by *P. aeruginosa*. To follow the expression of the *pfeA* and *foxA* genes, we used promoter fusions in which the promoter sequences of the *pfeA* or *foxA* gene were fused to the coding sequence of a reporter that can be easily detected or quantified.⁴⁰ In the promoter fusions, the transcription of the reporter gene is controlled by the promoter sequences of the gene of interest, which in turn controls the quantity of mRNA transcribed and, subsequently, that of the protein synthesized. Here, we used the red fluorescent protein mCherry because of its well-documented stability and efficiency as a reporter.⁴¹⁻⁴³ The promoter regions of *pfeA* and *foxA* both contain a Fur box, involved in transcriptional regulation via the regulator Fur and the bacterial intracellular iron concentration (Figure 1). *pfeA* transcription is also positively regulated by a two-component system involving the inner membrane sensor *PfeS* and the transcriptional regulator *PfeR*.^{27,44,45} Consequently, the *pfeA* promoter region also contains a sequence that interacts with *PfeR* (Figure 1A). Dean *et al.* identified the various sequences recognized by *PfeR* in the promoter sequence of *pfeA*, and called them A1, A2, B1, and B2 (Figure 1A).⁴⁴ These binding sites consist of pairs of palindromic sequences located upstream of and near the starting codon of *pfeA*. *foxA* transcription is positively regulated by a sigma factor (*FoxI*) and its anti-sigma factor (*FoxR*),³⁰ and the promoter region of *foxA* contains the sequences I1 and I2, predicted to be recognized by *FoxI* (Figure 1B). Surprisingly, one copy of each palindromic sequence A and B found in the promoter region of *pfeA* is also found in the promoter region of *foxA*. The role they play in the regulation of *foxA* transcription is unknown.

For both genes, we selected a 255-bp sequence directly upstream of the the ATG codon. These two regions, followed by the DNA sequence of mCherry, were inserted into the genome of *P. aeruginosa* between the *glmS* and PA5548 genes and the strains generated are called *prompfeA-mCherry* and

promfoxA-mCherry, respectively (Table S1). This site on the chromosome, well conserved between *P. aeruginosa* isolates, has already been used to insert the 4500 bp of the pUC18T mini-Tn7T-Gm vector, derived from the Tn7 transposon.⁴⁶ We found that insertion of our sequence in the genome of *P. aeruginosa* did not significantly modify transcription of the *glmS* or *PA5548* genes located next to the insertion locus by RT-qPCR: similar levels of transcription of these two genes were observed in the *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry strains grown in the presence of either ENT or NOCA as in wild type PAO1 (Figure S3). We also checked that the addition of a second promoter in the genome did not interfere with the transcription of *pfeA* and *foxA*, again by RT-qPCR. Indeed, we observed similar levels of *pfeA* and *foxA* transcription in PAO1 as in the *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry strains grown in the presence of either ENT or NOCA (Figure S4).

A

1	CCTCCCCTACCAGCGCCTGGACGATAGCGCCGGCGAAGGTTTCGGCCTCG	50
	A1	
51	GCCTGGCGATCGCCCGGCGGCCATCGAGCTACAG <u>GGCGGCCG</u> GCTCTGG	100
	B1 A2	
101	GCCAGCAACGGCAA <u>GCCCGGA</u> TTGTGCCTGCACCTGTGGCTGCC <u>GGCGGC</u>	150
	Fur box B2	
151	<u>CGCCTGAGGGCGAAGTGT</u> TTAGAAAGTTAATGCGCTTACTCTC <u>AAATAA</u>	200
201	<u>CAATCAATATC</u> ATTTGTGATCTCTTGCATTTCGCTGCATT <u>GCCCGGA</u> GAT	250
251	CACCGATG → <i>pfeA</i>	

B

	B1	
1	CGGGGTCTATCGCCTGGACGACACCGACAAGCTGCTGCAGGTGCTC <u>GCGC</u>	50
51	<u>GGA</u> CCCTGCCGGTGC GCCTGCAGCGACATACCCGCTGGTGGGTGAGGGTG	100
	A1	
101	GTCGCCGCTGAGTCGCGCC <u>GGCGGCCG</u> CGTGACGCTTGCTTTCGTCCG	150
	I1 Fur box I2	
151	GAGCGAAACGCACT <u>GAAAATTATTTTCATTATTTT</u> <u>TGTCGGC</u> TTTCCGCG	200
201	ACTGGTCCGGCTTTACCGATTGAACACCCTTCAACGACTCCAACGGATCC	250
251	CGTTCATG → <i>foxA</i>	

Figure 1. Promoter sequences selected for transcriptional fusion. DNA sequences upstream of the ATG codon of *pfeA* (A) and *foxA* (B). The Fur box for both genes is highlighted, as are the binding sites of PfeR (A1, A2; B1, B2) for *pfeA* and the predicted binding sites of FoxI (I1, I2) for *foxA*. For *pfeA*, A1: [86 - 93]; B1: [115 - 121]; A2: [145 - 152]; Fur box: [195 - 211]; B2: [241 - 247]. For *foxA*, B1: [47 - 53]; A1: [121 - 128]; I1: [165 - 170]; Fur box: [165 - 182]; I2: [186 - 191]. The two 255-bp sequences presented here were used as promoter regions to construct the fluorescent reporter strains *prompfeA-mCherry* and *promfoxA-mCherry*

Regulation of *mCherry* transcription by the promoter regions of *pfeA* and *foxA*. We used a RT-qPCR approach to verify that there is, indeed, a correlation between the level of transcription of the *mCherry* gene and that of *pfeA* or *foxA* in the *prompfeA*-*mCherry* and *promfoxA*-*mCherry* strains, respectively. Such a correlation is essential to use *mCherry* fluorescence to follow *pfeA* and *foxA* expression in *prompfeA*-*mCherry* and *promfoxA*-*mCherry*. The two strains were grown under iron-restricted conditions (CAA medium) in the presence of increasing concentrations of ENT or NOCA, respectively, and the transcription of the *mCherry*, *foxA*, and *pfeA* genes monitored by RT-qPCR (Figure 2). The mRNA levels of both *pfeA* and *mCherry* increased in the *prompfeA*-*mCherry* strain as a function of the ENT concentration with a similar sigmoid shape. Transcription started at approximately 0.1 μM ENT and the maximal level of mRNA synthesis was reached at 3 μM for both genes. As the two data sets showed a sigmoid shape, the data were fitted using the Hill equation (1) ⁴⁷⁻⁴⁹

$$H(x) = y_0 + (y_{max} - y_0) \cdot \frac{x^n}{K^n + x^n} \quad (1)$$

with $H(x)$ as the genetic expression, x the concentration of the siderophore, y_0 the basal genetic expression, y_{max} the maximal genetic expression, K the effective affinity, defined as the siderophore concentration needed for the genetic expression to be half of the maximal expression, and n the Hill coefficient, which determines the steepness at the transition between the inactive and active state around $x = K$. We applied the non-linear least-square minimization algorithm to fit the equation (1) with the experimental measurements and found the following values for the model parameters : $y_0 = 2.06$, $y_{max} = 28.47$, $n = 1.09$, $K = 0.29 \mu\text{M}$ for *pfeA* and $y_0 = 1.33$, $y_{max} = 10.37$, $n = 1.55$, and $K = 0.40 \mu\text{M}$ for *mCherry*. However, the transcription levels of the transporter gene *pfeA* were higher than those of *mCherry* for all ENT concentrations tested.

For the *promfoxA*-*mCherry* strain, the transcription levels of *foxA* and *mCherry* followed the increasing gradient of NOCA concentrations in a similar logarithmic manner, but not as a sigmoid curve as for *pfeA* in the *prompfeA*-*mCherry* strain. The maximum transcription for both genes was apparently not

reached at 100 μM NOCA (Figure 2). A piecewise linear equation in the logarithmic domain (2) was used to model this behavior as follows:

$$L(x) = \begin{cases} 0, & x < x_E \\ a \cdot \log_{10}\left(\frac{x}{x_E}\right), & x \geq x_E \end{cases} \quad (2)$$

with $L(x)$ as the genetic expression, x the concentration of the siderophore, a the slope of this logarithmic model, and x_E the threshold above which the logarithmic behavior starts. We used the same fitting algorithm and found $a = 15.58$, $x_E = 0.42 \mu\text{M}$ for *foxA* and $a = 13.58$, $x_E = 0.56 \mu\text{M}$ for *mCherry*. The level of transcription of the transporter gene *foxA* was also higher than that of *mCherry*.

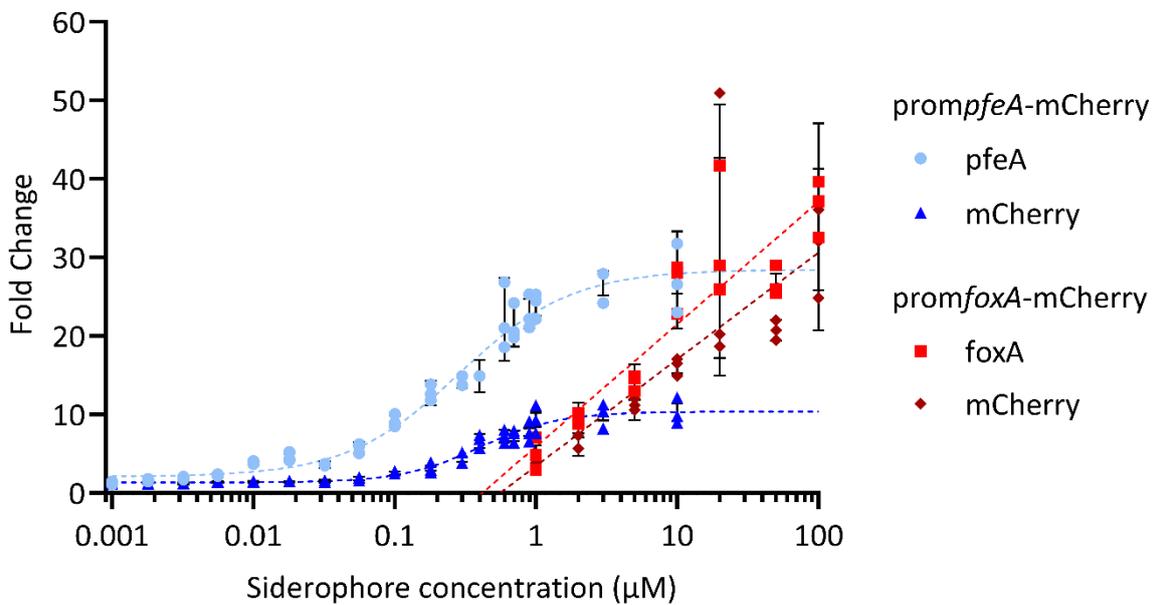


Figure 2. Correlation between *mCherry* and *pfeA* or *foxA* transcription in *prompfeA-mCherry* and *promfoxA-mCherry* cells in the presence of increasing concentrations of ENT and NOCA, respectively.

The *P. aeruginosa* *prompfeA-mCherry* and *promfoxA-mCherry* strains were grown for 8 h in CAA medium in the absence or presence of increasing concentrations of ENT (0.001 to 10 μM) or NOCA (1 to 100 μM). The transcription of *pfeA* (light blue points) and *mCherry* (dark blue triangles) was followed by RT-qPCR in *prompfeA-mCherry* and *foxA* (red squares) and *mCherry* (dark red diamonds) in *promfoxA-mCherry*. The results are expressed as the ratio of the values obtained for the growth in the presence of the siderophores to those obtained in their absence. Each concentration of ENT or NOCA

was tested using biological triplicates. The error bars represent the standard errors calculated by CFX Maestro™ Software (Bio-Rad). The reference genes used were *clpX* and *rpoD*. The data for *prompfeA*-mCherry were fitted using the Hill equation (1), as the two data sets showed a sigmoid shape. The two data sets for *promfoxA*-mCherry showed a linear shape in the logarithmic domain and, thus, a logarithmic equation (2) was used for each fit.

Both the *pfeA* and *mCherry* RT-qPCR fold-change data sets followed a sigmoid-shaped curve, but their Hill equation parameters showed differences. The parameters y_0 , n , and K from the two equations were relatively close to each other, but y_{max} was much higher for *pfeA* than *mCherry*. To quantitatively assess the likelihood of the expression of *pfeA* and *mCherry*, we first normalized the data and then compared them. The method was the following: we i) normalized the data (\widehat{FC}_{pfeA} and \widehat{FC}_{mCh}) between 0 and 1 and put them together in a single dataset we named *pfeA+mCherry*, ii) fit this dataset with a single Hill equation $\widehat{H}(x)$, and iii) compared the estimated root mean square error (RMSE) $RMSE_{pfeA}$ and $RMSE_{mCh}$ between this model, which corresponds to the common trend, and the normalized data of each experimental set taken individually (that for *pfeA* and *mCherry*).

$$\widehat{H}(x) = \frac{x^n}{K^n + x^n} \quad (3)$$

$$\widehat{FC}_{pfeA} = \frac{FC_{pfeA} - y_{0\ pfeA}}{y_{max\ pfeA} - y_{0\ pfeA}} \quad (4)$$

$$\widehat{FC}_{mCh} = \frac{FC_{mCh} - y_{0\ mCh}}{y_{max\ mCh} - y_{0\ mCh}} \quad (5)$$

The normalized and pooled data sets are presented in Figure 3A with the fitted Hill curves. We calculated the RMSE between the normalized *pfeA* and *mCherry* whole data sets and the *pfeA+mCherry* Hill equation. We found RMSE values of 0.052 and 0.051 for the comparison of the *pfeA* data set versus that of *pfeA+mCherry* and the *mCherry* data set versus that of

pfeA+mCherry, respectively. We also calculated the RMSE solely for the transition phase by reducing the range of the dataset on the *y*-axis, first between 10% and 90% of maximal expression and then between 20% and 80% of maximal expression. We found RMSE values of 0.065 and 0.070 for *pfeA* and *mCherry*, respectively, for the first range and 0.070 and 0.071, respectively, for the second. Therefore, the error of our *pfeA+mCherry* model is approximately 7%. To obtain an idea of what such an error represents, we calculated the dispersion, which intrinsically exists in the data, by calculating the RMSE between the data and the Hill dataset-specific model for both genes. All RMSE values were of the same order of magnitude, regardless of the domain. Thus, modeling both datasets using a unique model did not appear to introduce any additional error to that intrinsically present in the dataset, suggesting that the model is valid. In conclusion, *pfeA* and *mCherry* behave in the same manner with respect to the siderophore concentration in qRT-PCR.

We normalized the data from *promfoxA-mCherry* using the same method and created the pooled data set *foxA+mCherry*. The logarithmic models of the normalized transcriptional expression data of *foxA* and *mCherry* and those of *foxA+mCherry* all had the same parameters ($\alpha = 0.5$ and $x_E = 1 \mu\text{M}$, Figure 3B). We calculated the RMSE between the normalized *foxA* and *mCherry* data sets and the *foxA+mCherry* logarithmic equation and found RMSE values of 0.123 and 0.151 for the comparison of the *foxA* data set versus that of *foxA+mCherry* and the *mCherry* data set versus that of *foxA+mCherry*, respectively. The error of our *foxA+mCherry* model is approximately 15%. Using the same approach as for *pfeA* and *mCherry*, we computed the intrinsic dispersion between the *foxA* or *mCherry* data and the *foxA+mCherry* model. The RMSE values between the data and the model were also of the same order of magnitude. The use of a single model for both data sets did not introduce any additional error beyond the intrinsic variability present in the data. Hence, the validity of the model remains unaffected. In conclusion, *foxA* and *mCherry* exhibit similar behavior as a function of the siderophore concentration in qRT-PCR.

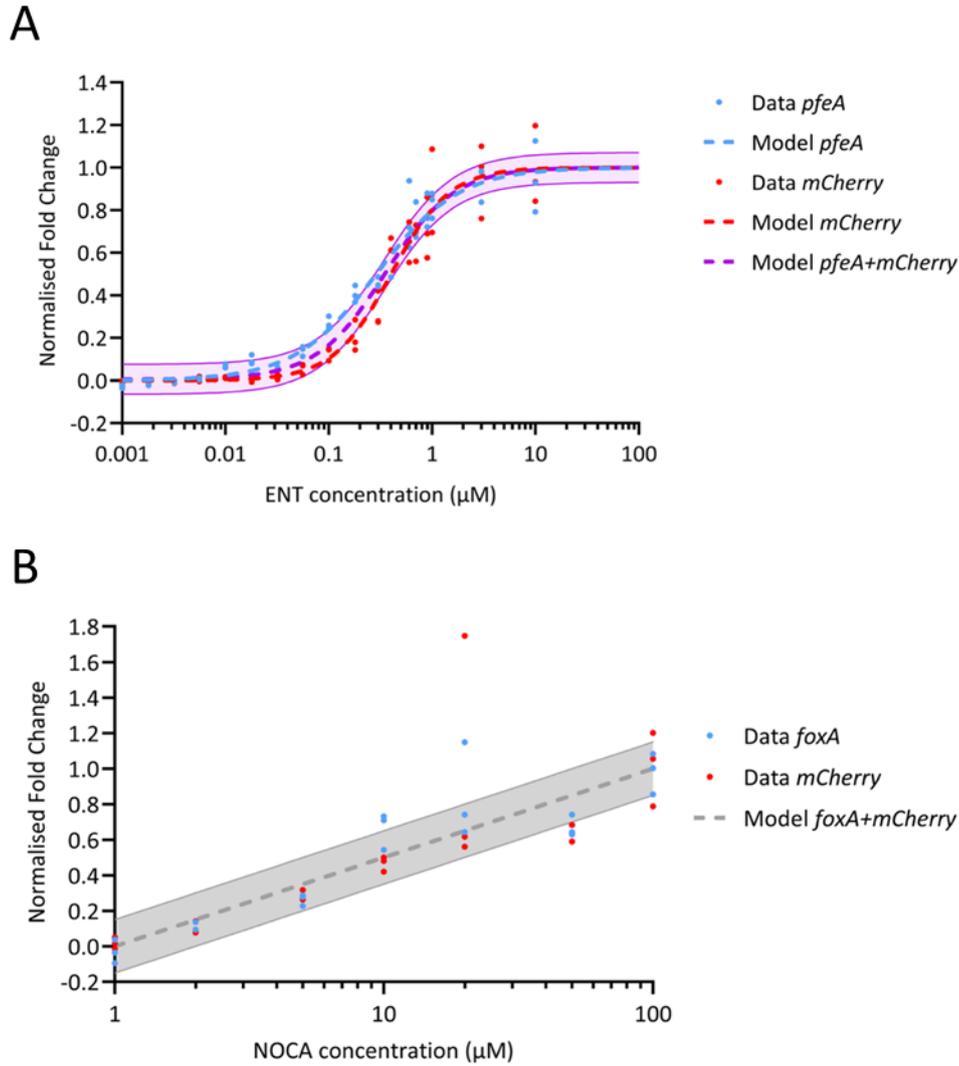


Figure 3. Normalization of *pfeA* and *mCherry* transcription. (A) The normalized data sets of RT-qPCR fold changes from the prom*pfeA*-*mCherry* strain are represented in blue for *pfeA* and in red for *mCherry* (data as dots and the Hill curve as the dashed line). The Hill curve of the *pfeA+mCherry* data set, with an error of $\pm 7\%$, is represented by the purple dashed line and the transparent purple area. (B) The normalized data sets of RT-qPCR fold changes from the prom*foxA*-*mCherry* strain are represented in blue for *foxA* and in red for *mCherry*. The logarithmic normalized data sets of *foxA*, *mCherry*, and *foxA+mCherry* are modeled using the same logarithmic equation, with an error of $\pm 15\%$ represented as a grey dashed line with a transparent grey area.

Overall, the *prompfeA-mCherry* and *promfoxA-mCherry* constructs meet all the criteria of a fusion reporter. For both constructs the transcription of *mCherry* follows that of the studied TBDT, demonstrating that *mCherry* transcription and expression are regulated by the promoter region of both TBDTs. However, it should be noted that we observed a higher level of transcription for the genes encoding the TBDT than that of *mCherry* for both constructs. This difference was more pronounced in the case of the fusion reporter carrying the *pfeA* promoter region. Interestingly, the transcription of both the *pfeA* and *foxA* genes appears to not respond in the same way nor with the same efficiency to the presence of their siderophores. Maximum transcription was reached for *pfeA* with 3 μM ENT, whereas the maximum was not reached for *foxA* with 100 μM NOCA.

mCherry expression modelling in both *prompfeA-mCherry* and *promfoxA-mCherry* cells. The transcription kinetics of *mCherry* and *pfeA* in *prompfeA-mCherry* and those of *mCherry* and *foxA* in *promfoxA-mCherry* follow the same dynamics, allowing the two fusion reporters to be used to monitor the expression of the two TBDTs under different growth conditions. Stimulation of *pfeA* or *foxA* transcription and expression lead to an increase in mCherry synthesis and, consequently, in the monitored fluorescence of mCherry. We followed *pfeA* and *foxA* expression by monitoring mCherry fluorescence during *prompfeA-mCherry* and *promfoxA-mCherry* growth in CAA medium with increasing concentrations of ENT and NOCA. Bacterial growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm ($\text{OD}_{600\text{ nm}}$) and the fluorescence of mCherry at 610 nm (excitation wavelength: 570 nm) as a function of time (Figure 4A and 4B). There was no significant increase in fluorescence for either construct at any tested concentration of ENT or NOCA for the first six hours of culture. For *prompfeA-mCherry*, we observed an increase in mCherry fluorescence during bacterial growth for concentrations of ENT of 0.1 μM or higher, with maximum fluorescence obtained at 3 μM ENT (Figure 4A). For *promfoxA-mCherry*, the monitored fluorescence of mCherry increased with increasing concentrations of NOCA and no saturation was observed (Figure 4B).

For each condition, the fluorescence data were treated as follows: the fluorescence data of the control (without siderophore) was first subtracted from the fluorescence of the condition of interest. Then, for each condition, the resulting fluorescence was divided by the $OD_{600\text{ nm}}$ ($Absorbance_{condition}$), which represents the density of the bacteria in the sample (7). Within a factor of one, the result can be considered to be the fluorescence signal emitted by a single bacterium.

$$(Fluorescence_{condition} - Fluorescence_{control}) / Absorbance_{condition} \quad (7)$$

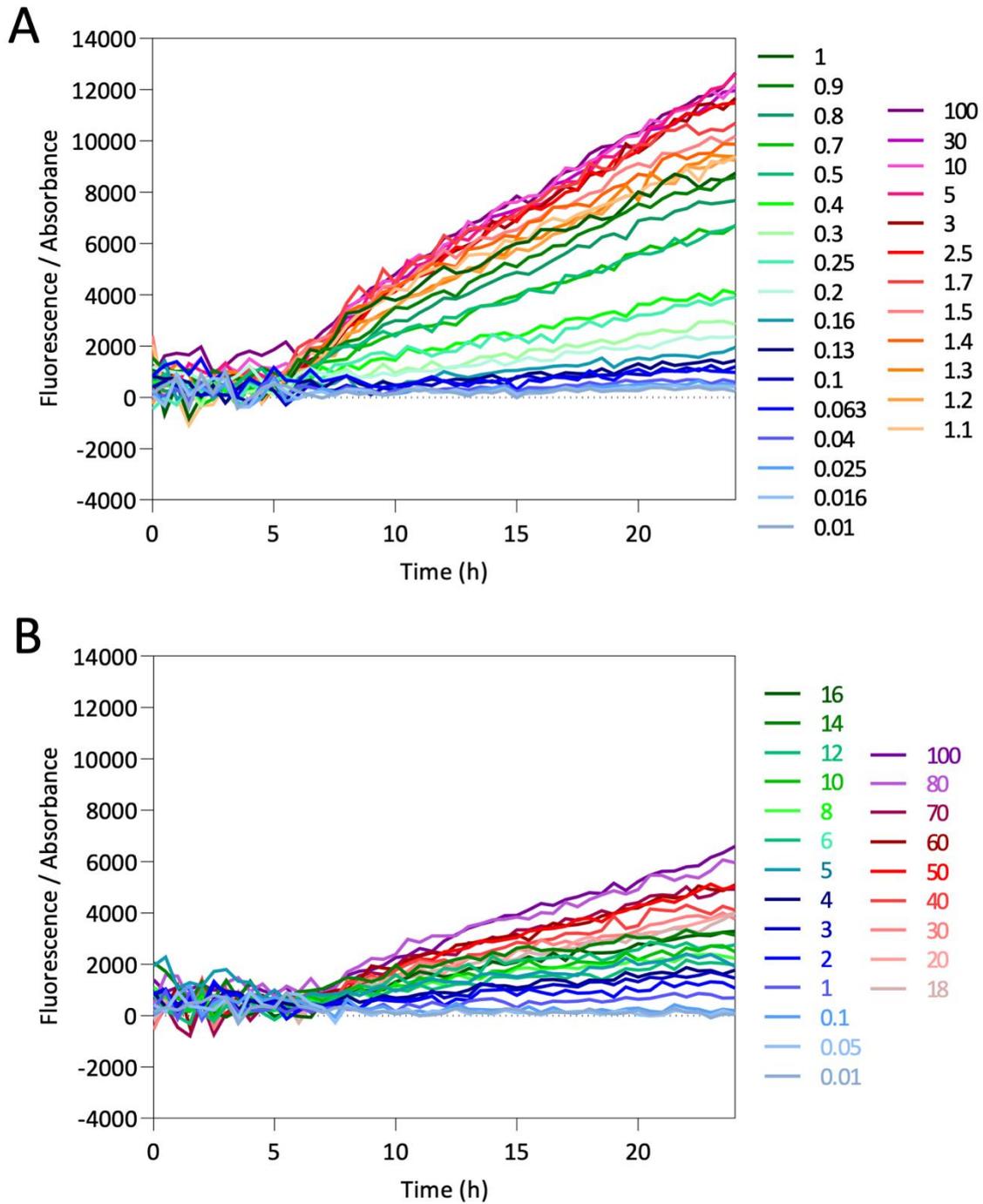


Figure 4. mCherry fluorescence monitored in both *prompfeA*-mCherry (A) and *promfoxA*-mCherry (B) strains. *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry strains were grown in CAA medium in the absence or presence of increasing concentrations of ENT and NOCA, respectively, and the $OD_{600\text{ nm}}$ and fluorescence of mCherry (excitation at 570 nm and emission at 610 nm) monitored. The bacterial fluorescence rate calculated using equation (7) is represented for each concentration. Three

independent experiments with three technical replicates were performed for each concentration of ENT and NOCA tested ($n = 3$). Only the means of the three data points are shown and no error bars are shown for convenience.

Rate of mCherry synthesis

To characterize all the curves of the fluorescence data shown in Figure 4, we fitted the synthesis equation (8) for each condition. We modeled the transient evolution of the fluorescence signal using two assumptions : i) the fluorescence signal is directly proportional to the concentration of mCherry: $F = k \cdot P$, where F is the fluorescence signal and P the concentration of mCherry, and ii) the temporal evolution of the concentration of mCherry can be modeled by a first-order differential equation (8) involving the gene expression β (in $\mu\text{M}/\text{h}$) and the degradation rate of mCherry d (in h^{-1}).

$$\frac{dP}{dt} = \beta - d \cdot P \quad (8)$$

The solution of this differential equation is given in (9)

$$P(t) = P_{\infty} \cdot (1 - e^{(-\frac{t-t_0}{\tau})}) \quad (9)$$

where P_{∞} is the concentration of mCherry at the steady state (concentration reached after an infinite time), t_0 represents the lag time or adaptation time (time between the start of culture and the beginning of mCherry synthesis, which also depends on the fluorescence detection threshold of the analytic instrument), and τ is the characteristic time, which is equal to $2.2/d$, and corresponds to the time required to reach 63% of P_{∞} .

According to equation (9), at steady state, we can state that

$$\beta = \frac{P_{\infty}}{\tau} \quad (10)$$

Thus, within a factor of one, the gene activity can be deduced from the fluorescence curve after having fitted this fluorescence using equation (9). For certain conditions, in particular, conditions in which the

fluorescence curve is close to zero, the fit of the synthesis equation (9) by the first-order model fails, leading to aberrant parameters (very-high P_{∞} and/or small τ). The data of these conditions were removed for further analysis. The β values of accepted conditions plotted for the strains *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry are shown in Figure 5. The rate of mCherry synthesis followed the gradient of ENT with a sigmoid shape for the *prompfeA*-mCherry strain and in a logarithmic manner for the gradient of NOCA in the *promfoxA*-mCherry strain.

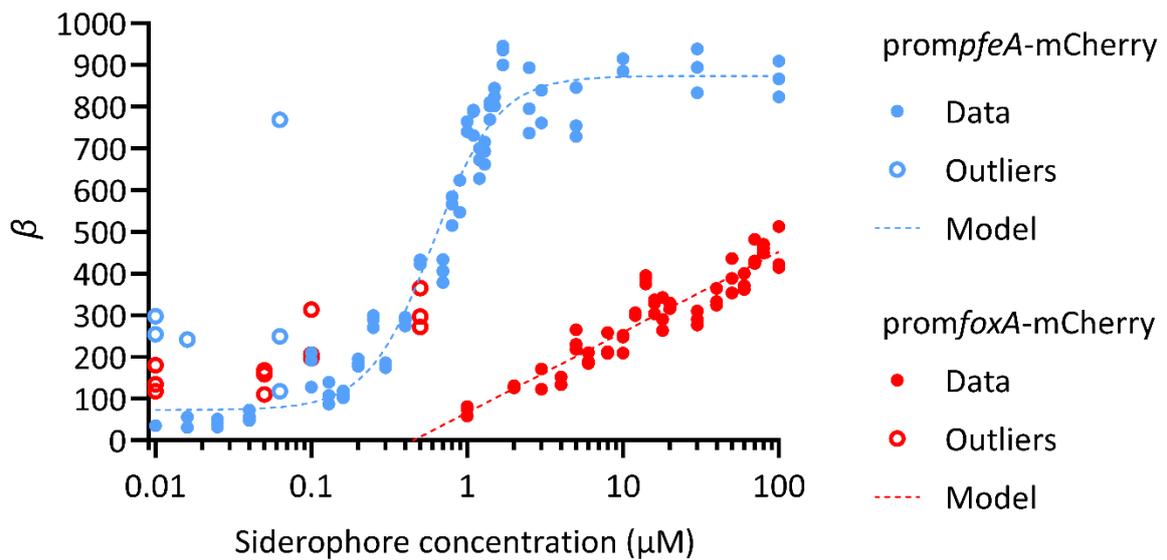


Figure 5. Fold change in *mCherry* synthesis in *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry cells grown in iron-restricted conditions and in the presence of increasing concentrations of ENT and NOCA, respectively. The β values of strain *prompfeA*-mCherry (filled blue circles, empty blue circles are outliers) are plotted according to the ENT concentration and those of strain *promfoxA*-mCherry (filled red circles, the empty red circles are outliers) according to the NOCA concentration. The sigmoid curve fitted with the Hill equation (1) on the *prompfeA*-mCherry data is represented by the blue dashed line and the parameters obtained were: $y_0 = 73.08$, $y_{max} = 874.07$, $n = 2.10$, $K = 0.61 \mu\text{M}$. The logarithmic model (2) based on *promfoxA*-mCherry data is represented by the red dashed line and the parameters obtained were: $a = 192.93$ and $x_E = 0.45 \mu\text{M}$. Outliers were not considered for either curve fitting.

We treated the fluorescence data for *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry as previously described to compare them to the RT-qPCR data. Again, we calculated the RMSE between the common model and the gene-specific model as a metric to assess the validity of this approach.

$$\widehat{FC}_{RT-qPCR} = \frac{FC_{RT-qPCR} - y_{0 RT-qPCR}}{y_{max RT-qPCR} - y_{0 RT-qPCR}} \quad (11)$$

$$\widehat{FC}_{Fluo} = \frac{FC_{Fluo} - y_{0 Fluo}}{y_{max Fluo} - y_{0 Fluo}} \quad (12)$$

The normalized and pooled data sets with the fitted models for *prompfeA*-mCherry are represented in Figure 6A. We performed a similar analysis as presented before and calculated the RMSE between the normalized *RT-qPCR* and *Fluo* whole data sets and the *RT-qPCR+Fluo* Hill equation. We found RMSE values of 0.068 and 0.107 for the comparison *RT-qPCR/RT-qPCR+Fluo* and *Fluo/RT-qPCR+Fluo*, respectively. We also calculated the RMSE for the transition phase, which involved first using only data between 0.1 and 0.9 and then 0.2 and 0.8 of the normalized fold change. The RMSE values were 0.083 and 0.099 for the data between 0.1 and 0.9 and 0.100 and 0.103 for the data between 0.2 and 0.8 for *RT-qPCR* and *Fluo* respectively. Thus, the error of our *RT-qPCR+Fluo* model is approximately 10%.

Applying a similar methodology as that used for the RT-qPCR data previously, we determined the inherent dispersion between the *RT-qPCR* or *Fluo* data and the *RT-qPCR+Fluo* model. The RMSE between the data and the model showed a comparable magnitude. The utilization of a single model for both datasets did not introduce any additional errors beyond the inherent variability in the data. Therefore, the validity of the model remains unaltered. Thus, the *RT-qPCR* and *Fluo* data, in other words, the transcriptional expression of *mCherry* and mCherry synthesis, appear to show analogous behavior in relation to the siderophore concentration.

As previously, for *promfoxA*-mCherry, both the transcriptional expression of *mCherry* and mCherry synthesis could be normalized and modeled by the logarithmic equation of *RT-qPCR+Flu*. The normalized models of the transcriptional expression of *mCherry* and mCherry synthesis and *RT-*

qPCR+Fluo all had the same parameters ($\alpha=0.5$ and $x_E=1\ \mu\text{M}$, Figure 6B). For the comparison of *RT-qPCR/RT-qPCR+Fluo*, the RMSE value was the same as that previously calculated, 0.151. We calculated the RMSE for the comparison of *Fluo/RT-qPCR+Fluo* and found a value of 0.087. Here, we also assessed the intrinsic dispersion between the *RT-qPCR* or *Fluo* data and the *RT-qPCR+Fluo* model. The RMSE between the data and the model were of similar magnitude. Employing a single model for both datasets did not introduce additional errors beyond the inherent variability. Thus, the model's validity remains unchanged, indicating analogous behavior between the *RT-qPCR* and *Fluo* data in response to the siderophore concentration.

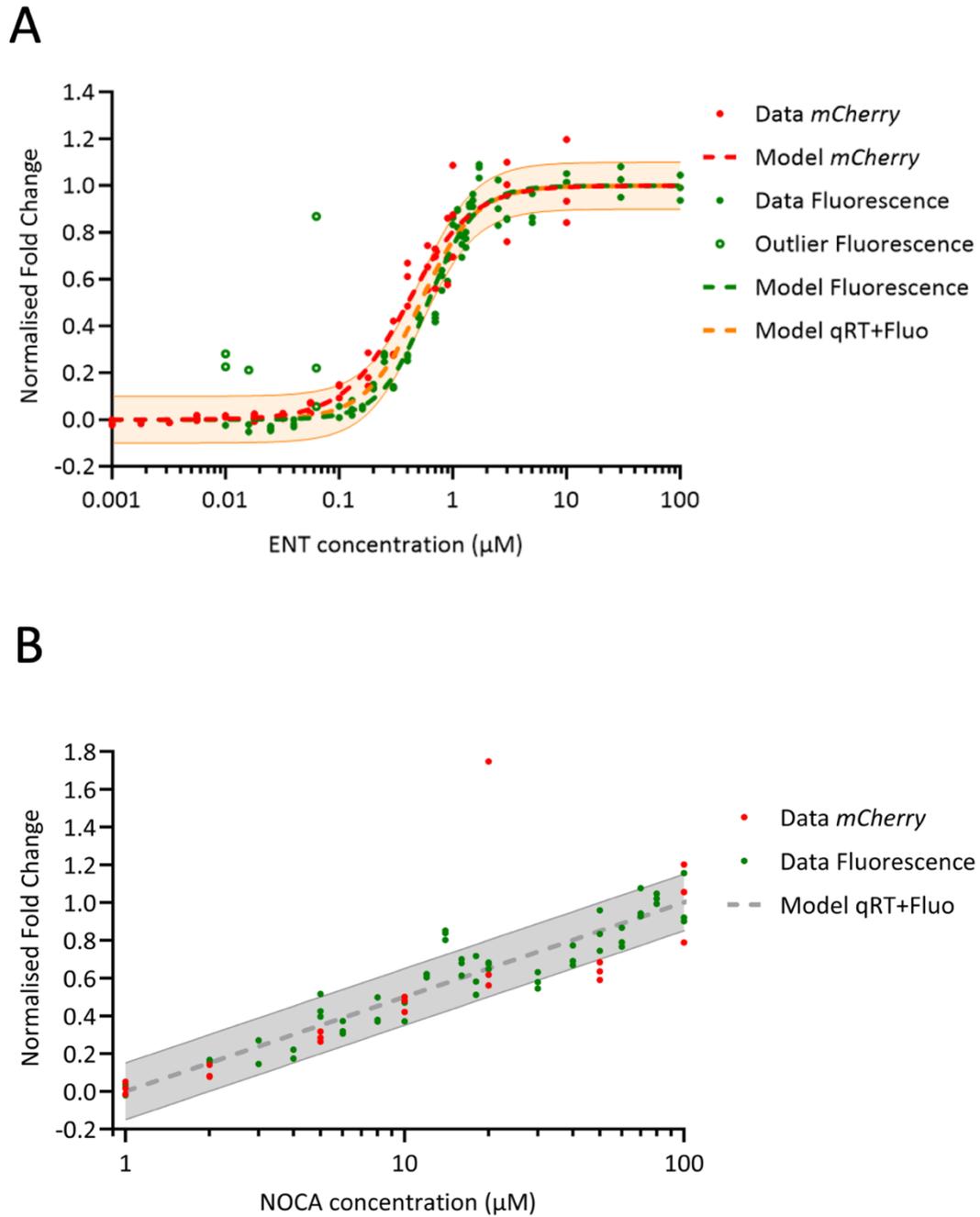


Figure 6. Normalization of the models from RT-qPCR data and fluorescence analysis. (A) The normalized set of RT-qPCR fold changes from *prompfeA*-*mCherry* for *mCherry* are represented in red and the normalized set of *beta* values from the fluorescence data in green (data as filled circles, outliers as empty circles, and the Hill curve as a dashed line). The Hill curve of *RT-qPCR+Fluo*, with an error of $\pm 10\%$, is represented as an orange dashed line with a transparent orange area. The table shows the Hill parameters of the different normalized data sets. (B) The normalized set of RT-qPCR fold

changes from *promfoxA-mCherry* for *mCherry* is represented in red and the normalized set of *beta* values from the fluorescence data in green. The normalized logarithmic model fitted for the three data sets is represented as a grey dashed line, with an error of $\pm 15\%$ indicated by the transparent grey area.

Discussion

The use of mathematical equations allows the quantification and prediction of biological processes, which can provide insights that may not be immediately apparent from experimental data alone. For example, mathematical modeling can be used to make predictions about the relationships between different variables, such as the relationship between mRNA and protein levels. Additionally, mathematical models can also help to identify potential sources of error or uncertainty in the data and can be used to simulate different scenarios and test the robustness of a model. However, mathematical modeling usually requires large datasets. Here, we developed two biological constructs that are very helpful for the rapid and low-cost generation of datasets to monitor the expression of the two TBDTs FepA and FoxA in *P. aeruginosa* cells to predict the future expression of different TBDTs present in the genome of *P. aeruginosa*, depending on the bacterial environment.

First, the constructed fluorescent reporters were created by fusing the promoter region of the genes encoding the TBDTs PfeA and FoxA (Figure 1) with the coding sequence of the fluorescent protein mCherry, used as reporter, to generate sufficient data for the mathematical modelling. These fusions were inserted into the genome of *P. aeruginosa* between the *glmS* and PA5548 genes, a region previously used for gene insertion.⁴⁶ With our *prompfeA-mCherry* and *promfoxA-mCherry* constructs,

an increase in fluorescent is expected when the expression of the gene encoding the TBDT is activated. Such constructs allow the screening of multiple conditions in 96-well microplates. RT-qPCR or proteomic approaches could have been used to follow the expression of genes encoding TBDTs,^{34–36,50} but such approaches are much more costly and time consuming and it is impossible to rapidly generate a large amount of data.

We conducted various tests to verify that the *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry constructs are reliable and that the mCherry fluorescence values are representative of the expression of the TBDT of interest. First, we used RT-qPCR to show that insertion of our sequence (TBDT promoter region with *mCherry*) in the genome of *P. aeruginosa* does not significantly modify the transcription of the *glmS* and *PA5548* genes and that the presence of two promoters in the genome (in front of the genes encoding the TBDT and mCherry) of *P. aeruginosa* does not interfere with the transcription of *pfeA* or *foxA*. We also verified that transcription of the gene encoding *mCherry* follows that of the gene encoding the studied TBDT for both constructs, demonstrating that *mCherry* transcription and expression are regulated by the promoter region of the TBDT of interest. RT-qPCR data showed parallel mRNA synthesis kinetics for the genes encoding mCherry and the TBDT of interest. However, we observed a higher level of transcription for the genes encoding PfeA or FoxA than *mCherry*, which was more pronounced for the fusion reporter carrying the *pfeA* promoter region. One possible reason is that the stability of the mRNA of *pfeA* or *foxA* and *mCherry* may differ, with the mRNA of *pfeA* or *foxA* being more stable, resulting in higher mRNA levels than for *mCherry*.

Overall, the controls we carried out show that the fluorescence of mCherry measured using our fluorescent reporters *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry is representative of the expression of the transporters PfeA and FoxA, respectively. The use of these fluorescent reporters was highly successful and allowed us to generate a large amount of data to study the effect of increasing concentrations of siderophores.

Modelling the data generated using our two fluorescent reporters showed that the expression of the *pfeA* and *foxA* genes in the two strains, *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry, does not respond in the same way or with the same efficiency to the presence of increasing concentrations of their corresponding siderophores. The transcription of *pfeA* showed a sigmoidal shape, whereas the transcription of *foxA* was logarithmic. Maximum transcription for *pfeA* was reached with 3 μM ENT, whereas the maximum was not reached for *foxA* with 100 μM NOCA (Figure 6). The Hill coefficient of the model suggests that the regulatory mechanism between *pfeA* and ENT is cooperative but that the transition between the expressed and inhibited states is smooth. The transition occurs just before 1 μM . Thus, the concentration of 10 μM ENT, which we generally used to activate *pfeA* transcription in previous publications,³⁴ is sensible and the behavior of the bacteria should not change much if the ENT concentration increases above 10 μM and should be stable for small variations of concentration around 10 μM .

On the other hand, the activation of *foxA* expression by NOCA was much weaker and we cannot consider that maximal expression is reached at 100 μM , which is our technical limit. At lower concentrations of NOCA, the changes in fluorescence were probably too small to be detected and at higher concentrations, NOCA started to precipitate. The logarithmic fitting used in this paper is only valid for the available range, but we have no idea of how the production rate evolves beyond 100 μM . Another consequence is that, in contrast to *pfeA*, the expression of *foxA* is not stable for concentrations around 10 μM and might change significantly, even for small variations of concentration around this value.

There are several possible explanations for the difference in the expression of *pfeA* and *foxA* as a function of the concentrations of their corresponding siderophores, the first being the different

transcriptional regulatory systems involved: *pfeA* transcription is regulated by a two-component system,^{27,45} whereas sigma and anti-sigma factors are involved for *foxA*.^{30,35} In the case of PfeA, the ENT-Fe complex has to bind to the PfeA binding site to be transported into the periplasm and interact in this cell compartment with the inner membrane sensor PfeS of the transcriptional regulatory system.²⁷ This PfeS-ENT-Fe interaction then liberates the transcriptional regulator PfeR to activate transcription of the *pfeA* gene. Nothing is known about the affinity of PfeS for ENT-Fe or the mechanism of interaction. In the case of *foxA* transcription, the NOCA-Fe complex has to interact with the FoxA binding site at the cell surface to obtain an interaction between the signaling domain of the TBDT and its anti-sigma factor FoxI.⁵¹ This protein interaction leads to dissociation of the transcriptional regulator FoxR from FoxI, which can then interact with the promoter region of *foxA* to drive the transcription of this gene. In this mechanism, the binding of NOCA-Fe to the PfeA binding site is a key step to induce the system. These two regulatory systems may not function with the same efficiency. They involve different protein-protein and siderophore-protein interactions and in the case of ENT-Fe, its uptake into the periplasm.

There are other factors upstream and downstream of these two regulatory cascades that can affect the efficiency of *pfeA* and *foxA* gene transcription. These include the affinity of the two siderophores for ferric iron, with ENT having a higher affinity than NOCA at neutral pH: $K_a = 10^{49} \text{ M}^{-1}$ for ENT and $K_a = 10^{32} \text{ M}^{-1}$ for NOCA.^{38,39} Despite this difference, the affinities are sufficiently strong for both siderophores for iron, to chelate it effectively in an environment where there is no competition with other siderophores and, consequently, the amount of siderophore-Fe complexes may be the same in both conditions (with ENT or NOCA).

In addition, when the siderophore-Fe complexes are formed, NOCA-Fe binds to its binding site on FoxA, located on the plug domain of the FoxA structure, with a K_d of 178 nM before being imported through the outer membrane.^{16,35} Unlike the NOCA-Fe/FoxA pair, ENT-Fe can interact with two binding sites on PfeA, one located in the extracellular loops and the second on the plug domain of PfeA.¹⁵ Affinity measurements showed that one of these sites is a high affinity site and the other a lower affinity site

($K_d = 60 \text{ nM}$ and $K_d = 155 \text{ }\mu\text{M}$ for the two binding sites on PfeA).¹⁵ Currently it is impossible to know which of the two sites identified by crystallography is the low or high affinity site. The differences between the binding of FoxA and PfeA to their siderophore-Fe complexes may affect the regulation of the transcription of the *foxA* and *pfeA* genes differently, as this binding step is essential in the regulatory process in both cases. Furthermore, in the cytoplasm, the promoter regions of the *pfeA* and *foxA* genes are different and the mechanisms of recognition of PfeR and FoxI are different and may also affect the efficiency of transcription.

The systems and mechanisms of transcriptional regulation of the genes involved in the two iron import pathways are different and highly complex, involving different protein-protein interactions and different interactions between proteins and the siderophore-Fe complexes. The mathematical model described in this paper is more a phenomenological model than a precise description of the biochemical mechanisms involved. The building of such a model would obviously be an asset in understanding regulatory phenomena but would require the parallel measurement of various concentrations of several molecules, which is not straightforward from an experimental point of view. Model refinement techniques could make it possible to generate hypotheses, but these can be very difficult to validate experimentally. Due to such complexity, it is currently impossible to identify which factor(s) is/are responsible for the large differences in the expression kinetics of the *foxA* and *pfeA* genes as a function of the concentration of their respective siderophores. As a next step, it would be informative to test other siderophores (analogues of ENT and NOCA) that can be recognized by these two TBDTs to determine whether they affect the expression of these two genes in the same way.

It would also be informative to test mixtures of different concentrations of ENT and NOCA and see the effect on the expression of these two genes in a situation in which both siderophores are in competition for iron. The tools that we have developed here can also help improve our understanding of the regulatory mechanisms involved in the expression of TBDTs. One can imagine, for example, testing deletions of genes encoding transcriptional regulators, such as PfeS/PfeR or FoxI/FoxR, or amino acid mutations of the binding sites of PfeA or FoxA and assessing the effect on our model.

In conclusion, the promoter fusions *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry are powerful tools to follow the expression of a TBDT in *P. aeruginosa*. Mathematical modelling of the data obtained showed that the expression of *pfeA* displays a sigmoidal shape, whereas it is logarithmic for *foxA*, with maximum transcription for *pfeA* at 3 μM ENT, whereas the maximum was not reached with 100 μM NOCA for *foxA*. These results have important implications for the understanding of how *P. aeruginosa* adapts the expression of its TBDTs to changing environmental conditions and highlight the value of using mathematical models as a tool to investigate iron homeostasis and, more generally, bacterial physiology. Our results provide a foundation for the development of a larger system for studying the regulation of all iron acquisition pathways of *P. aeruginosa*.

Material and Methods

Chemicals. Enterobactin (ENT) was purchased from Sigma-Aldrich and Nocardamine (NOCA) was purified as previously described.⁵²

Bacterial Strains and Growth Conditions. *P. aeruginosa* strains used in this study are listed in Table S1 in Supplemental Materials. Bacteria were first grown in Lysogeny Broth (LB) at 30°C overnight. Afterwards, they were pellet, washed and resuspended in iron-deficient CAA (casamino acid) medium (composition: 5 g L⁻¹ low-iron CAA (Difco), 1.46 g L⁻¹ K₂HPO₄ 3H₂O, 0.25 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O) and grown over night at 30°C. In order to monitor growth in the presence of siderophores, cells were resuspended again in fresh CAA medium at an optical density at 600 nm (OD_{600 nm}) of 0.01, grown in 96 well plates, in the absence or presence of increasing concentrations of ENT (0.001-100 μM) or NOCA (0.01-100 μM). Plates were incubated at 30 °C, with shaking every 15 min, in a microplate reader (Infinite® 200

PRO M Nano+, Tecan). Growth was followed by measuring the OD_{600 nm} and the fluorescence of mCherry (excitation at 570 nm and emission at 610 nm) every 30 min, for 24 h.

Construction of the *prompfeA*–mCherry and *promfoxA*–mCherry strains. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) was used as the host strain for the plasmids. The DNA fragments from *P. aeruginosa* used for cloning were amplified from the genomic DNA of strain PAO1 with Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo-Fisher Scientific). The insertion of the sequence was done in the intergenic region between *glmS* and *PA5548* using a pEXG2 plasmid.⁵³ The construction of the plasmids was realized with the NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix. The primers are listed in Table S2 in Supplemental Materials. As previously described, recombinant clones were isolated and then verified by PCR and Sanger sequencing.³⁷

Quantitative Real-time PCR Analyses. Specific gene transcription was measured by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). Overnight cultures of bacterial cells grown in CAA medium were pelleted, resuspended and diluted in fresh medium to obtain an OD_{600 nm} of 0.1. The cells were then grown with or without siderophores, under shaking, at 30 °C for 8 h. Afterward, 2.5 × 10⁸ cells were mixed with two volumes of RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen). Samples were lysed in Tris-EDTA at pH 8.0 containing 15 mg mL⁻¹ lysozyme (Sigma-Aldrich) for 15 min at 25 °C. Afterwards, total RNA was extracted using an RNeasy MinElute Spin Columns and gDNA Eliminator Spin Columns from RNeasy Plus Micro Kit (Quiagen). A treatment by DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen) was realized for each sample. Reverse transcription of RNA was done using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) with 1 µg of input RNA. Gene expression was measured with a CFX Opus 96 Real-Time PCR Instrument (Bio-Rad) using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and the appropriate primers (listed in Supporting Information Table 2). Five genes (*rpoD*, *clpX*, *rpsL*, *proC* and *uvrD*) were tested as reference genes using the Reference Gene Selector Tool based on GeNorm in CFX Maestro™ Software (Bio-Rad).

PAO1, *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry strains were grown for 8 h in the absence and presence of siderophores (10 μ M ENT for PAO1 and *prompfeA*-mCherry, 100 μ M of NOCA for PAO1 and *promfoxA*-mCherry). We have chosen to use *clpX* and *rpoD* in our assays because their stability across the different conditions were the highest (Figure S2). For the data analysis, the quantification cycles were determined by regression and the fold-change calculated with the Pfaffl Method.

Data processing and Mathematical modeling. All the data processing and the mathematical modeling was done with Python 3.8 (<https://www.python.org/>) and packages (<https://pypi.org/>): Pandas was used to manipulate and manage the data; NumPy and SciPy were used to process the data and create the models; Matplotlib was used for visualizations. The equation parameters were found by using the curvefit function from `scipy.optimize` on our experimental data.

Data Availability

All generated data are included in this manuscript and Supplementary files.

Reference

1. Ratledge, C. & Dover, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 881–941 (2000).
2. Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215–37 (2003).
3. Ratledge, C. Iron metabolism and infection. *Food. Nutr. Bull.* 28, S515-523 (2007).
4. Andrews, S. *et al.* Control of iron metabolism in bacteria. *Met. Ions Life Sci.* 12, 203–239 (2013).
5. Bullen, J. J., Rogers, H. J. & Griffiths, E. Role of Iron in Bacterial Infection. in *Current Topics in Microbiology and Immunology: Volume 80* (eds. Arber, W. *et al.*) 1–35 (Springer, 1978). doi:10.1007/978-3-642-66956-9_1.
6. Hider, R. C. & Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637–57 (2011).
7. Schalk, I. J., Mislin, G. L. A. & Brillet, K. Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters. *Curr. Top. Membr.* 69, 37–66 (2012).
8. Freed, D. M., Lukasik, S. M., Sikora, A., Mokdad, A. & Cafiso, D. S. Monomeric TonB and the Ton box are required for the formation of a high-affinity transporter-TonB complex. *Biochemistry* 52, 2638–2648 (2013).
9. Gresock, M. G., Kestead, K. A. & Postle, K. From Homodimer to Heterodimer and Back: Elucidating the TonB Energy Transduction Cycle. *J. Bacteriol.* 197, 3433–3445 (2015).
10. Klebba, P. E. ROSET Model of TonB Action in Gram-Negative Bacterial Iron Acquisition. *J. Bacteriol.* 198, 1013–1021 (2016).
11. Celia, H. *et al.* Cryo-EM structure of the bacterial Ton motor subcomplex ExbB-ExbD provides information on structure and stoichiometry. *Commun. Biol.* 2, 358 (2019).
12. Celia, H., Noinaj, N. & Buchanan, S. K. Structure and Stoichiometry of the Ton Molecular Motor. *Int. J. Mol. Sci.* 21, (2020).

13. Ratliff, A. C., Buchanan, S. K. & Celia, H. Ton motor complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 67, 95–100 (2021).
14. Moynié, L. *et al.* Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, (2017).
15. Moynié, L. *et al.* The complex of ferric-enterobactin with its transporter from *Pseudomonas aeruginosa* suggests a two-site model. *Nat. Commun.* 10, 3673 (2019).
16. Josts, I., Veith, K. & Tidow, H. Ternary structure of the outer membrane transporter FoxA with resolved signalling domain provides insights into TonB-mediated siderophore uptake. *eLife* 8, e48528 (2019).
17. Gudmundsdottir, A., Bell, P. E., Lundrigan, M. D., Bradbeer, C. & Kadner, R. J. Point mutations in a conserved region (TonB box) of *Escherichia coli* outer membrane protein BtuB affect vitamin B12 transport. *J. Bacteriol.* 171, 6526–33 (1989).
18. Tuckman, M. & Osburne, M. S. In vivo inhibition of TonB-dependent processes by a TonB box consensus pentapeptide. *J. Bacteriol.* 174, 320–323 (1992).
19. Sean Peacock, R., Weljie, A. M., Peter Howard, S., Price, F. D. & Vogel, H. J. The solution structure of the C-terminal domain of TonB and interaction studies with TonB box peptides. *J. Mol. Biol.* 345, 1185–97 (2005).
20. Buchanan, S. K. *et al.* Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* 6, 56–63 (1999).
21. Schalk, I. J. & Perraud, Q. *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environ Microbiol* 25, 811-831 (2023) doi:10.1111/1462-2920.16328.
22. Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–64 (2000).
23. Fillat, M. F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch. Biochem. Biophys.* 546, 41–52 (2014).

24. Pérard, J. *et al.* Quaternary Structure of Fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. *Biochemistry* 55, 1503–1515 (2016).
25. Pinochet-Barros, A. & Helmann, J. D. Redox Sensing by Fe²⁺ in Bacterial Fur Family Metalloregulators. *Antioxid. Redox Signal* 29, 1858–1871 (2018).
26. Sevilla, E., Bes, M. T., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. Fur-like proteins: Beyond the ferric uptake regulator (Fur) paralog. *Arch. Biochem. Biophys.* 701, 108770 (2021).
27. Dean, C. R. & Poole, K. Expression of the ferric enterobactin receptor (PfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* 8, 1095–103 (1993).
28. Visca, P., Leoni, L., Wilson, M. J. & Lamont, I. L. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 45, 1177–90 (2002).
29. Michel, L., Gonzalez, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T. & Reimmann, C. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol. Microbiol.* 58, 495–509 (2005).
30. Llamas, M. A. *et al.* Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol. Microbiol.* 67, 458–72 (2008).
31. Gasser, V. *et al.* The Esterase PfeE, the Achilles' Heel in the Battle for Iron between *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2814 (2021).
32. Luscher, A. *et al.* Plant-Derived Catechols Are Substrates of TonB-Dependent Transporters and Sensitize *Pseudomonas aeruginosa* to Siderophore-Drug Conjugates. *mBio* e0149822 (2022) doi:10.1128/mbio.01498-22.
33. Gasser, V. *et al.* Catechol siderophores repress the pyochelin pathway and activate the enterobactin pathway in *Pseudomonas aeruginosa*: an opportunity for siderophore-antibiotic conjugates development. *Environ. Microbiol.* 18, 819–832 (2016).
34. Perraud, Q. *et al.* Phenotypic Adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Mol. Cell Proteomics* 19, 589–607 (2020).

35. Normant, V. *et al.* Nocardamine-Dependent Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Exclusive Involvement of the FoxA Outer Membrane Transporter. *ACS Chem. Biol.* 15, 2741–2751 (2020).
36. Normant, V. *et al.* How the Presence of Hemin Affects the Expression of the Different Iron Uptake Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* Cells. *ACS Infect. Dis.* 8, 183–196 (2022) doi:10.1021/acsinfecdis.1c00525.
37. Perraud, Q. *et al.* Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 24, 878–893 (2022).
38. Loomis, L. & Raymond, K. N. Solution equilibria of enterobactin complexes. *Inorg. Chem.* 30, 906–911 (1991).
39. Anderegg, G., L'Eplattenier, F. & Schwarzenbach, G. Hydroxamatkomplexe III. Eisen(III)-Austausch zwischen Sideraminen und Komplexonen. Diskussion der Bildungskonstanten der Hydroxamatkomplexe. *Helv. Chim. Acta* 46, 1409–1422 (1963).
40. Casadaban, M. J. Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104, 541–555 (1976).
41. García-Cayuela, T. *et al.* Fluorescent protein vectors for promoter analysis in lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 171–181 (2012).
42. Mohedano, M. L. *et al.* Construction and validation of a mCherry protein vector for promoter analysis in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 247–253 (2015).
43. Garay-Novillo, J. N., García-Morena, D., Ruiz-Masó, J. Á., Barra, J. L. & Del Solar, G. Combining Modules for Versatile and Optimal Labeling of Lactic Acid Bacteria: Two pMV158-Family Promiscuous Replicons, a Pneumococcal System for Constitutive or Inducible Gene Expression, and Two Fluorescent Proteins. *Fron.t Microbiol.* 10, 1431 (2019).
44. Dean, C. R., Neshat, S. & Poole, K. PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 178, 5361–5369 (1996).
45. Gasser, V. *et al.* The esterase PfeE, Achilles heel in the battle for iron between *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2814 (2021).

46. Choi, K.-H. *et al.* A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* 2, 443–448 (2005).
47. Santillán, M. On the Use of the Hill Functions in Mathematical Models of Gene Regulatory Networks. *Math. Model. Nat. Phenom.* 3, 85–97 (2008).
48. Goutelle, S. *et al.* The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22, 633–648 (2008).
49. Bottani, S. & Veitia, R. A. Hill function-based models of transcriptional switches: impact of specific, nonspecific, functional and nonfunctional binding: Modeling of transcriptional switches. *Biol. Rev.* 92, 953–963 (2017).
50. Perraud, Q. *et al.* Phenotypic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in the Presence of Siderophore-Antibiotic Conjugates during Epithelial Cell Infection. *Microorganisms* 8, (2020).
51. Llamas, M. A., Imperi, F., Visca, P. & Lamont, I. L. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 569–97 (2014).
52. Meyer, J. M. & Abdallah, M. A. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107, 319–328 (1978).
53. Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S. L. & Mekalanos, J. J. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8006–8011 (2005).

Acknowledgements

The presented work was supported by a grant from the CNRS (80/Prime 2020), as well as with a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR, grant number: ANR-22-CE44-0024-01). We also acknowledge the Interdisciplinary Thematic Institute (ITI) InnoVec (Innovative Vectorization of Biomolecules, IdEx, ANR-10-IDEX-0002).

Author contribution

Thibaut Hubert: carried out all the experiments and mathematical modelling, writing first draft of the manuscript. Morgan Madec: Conceptualization, supervised all the mathematical modelling, writing – review & editing, funding acquisition. Isabelle J. Schalk: Conceptualization, supervised all the biological experiments, writing – review & editing, funding acquisition, project administration. All authors reviewed the manuscript.

Competition interest

The authors declare no conflict of interest.

Supplementary Materials

Experimental and computational methods to highlight behavioural variations in TonB-dependent transporter expression in *Pseudomonas aeruginosa* versus siderophore concentration

Thibaut Hubert^{1,2,3}, Morgan Madec^{3*}, Isabelle J. Schalk^{1,2*}

Table S1. Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Collection ID	Relevant characteristics	References
<i>P. aeruginosa</i>			
PAO1	PAO1	<i>P. aeruginosa</i> wild-type strain	¹
prom <i>pfeA</i> -mCherry	PAS1111	PAO1 with the promoter sequence of <i>pfeA</i> followed by <i>mcherry</i> inserted in the genome	This study
prom <i>foxA</i> -mCherry	PAS1112	PAO1 with the promoter sequence of <i>foxA</i> followed by <i>mcherry</i> inserted in the genome	This study
<i>E. coli</i>			
TOP10		<i>F</i> - <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL(Str^R)</i> <i>endA1</i> λ	Invitrogen
Plasmids			
pTH1	551	pEXG2 carrying the promoter sequence of <i>pfeA</i> followed by the sequence of mCherry	This study
pTH2	552	pEXG2 carrying the promoter sequence of <i>foxA</i> followed by the sequence of mCherry	This study

Table S2. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotides	Sequences (5' to 3')	Use
<i>ppfeA</i> F	CGTAACTAGTCCTCCCCTACCAGCGCCT	Construction plasmid pTH1
<i>ppfeA</i> R	TTCTAGACATCGGTGATCTCCGGGCAATG	Construction plasmid pTH1
pEXG2 <i>ppfeA</i> F	GAGATCACCGATGTCTAGAAGCAAGGGC	Construction plasmid pTH1
pEXG2 <i>ppfeA</i> R	GTAGGGGAGGACTAGTTACGTGGCCTGTAG	Construction plasmid pTH1
<i>pfoxA</i> F	CGTAACTAGTCGGGGTCTATCGCCTGGAC	Construction plasmid pTH2
<i>pfoxA</i> R	TTCTAGACATGAACGGGATCCGTTGGAG	Construction plasmid pTH2
pEXG2 <i>pfoxA</i> F	GATCCCGTTCATGTCTAGAAGCAAGGGC	Construction plasmid pTH2
pEXG2 <i>pfoxA</i> R	ATAGACCCCGACTAGTTACGTGGCCTGTAG	Construction plasmid pTH2
<i>clpX</i> F	CTGCGCTCATGCAGATCCT	RT-qPCR
<i>clpX</i> R	TCGAACAGCTTGGCGTACTG	RT-qPCR
<i>proC</i> F	GGCGTATTTCTTCTGCTGA	RT-qPCR
<i>proC</i> R	TGGCCTGGAAGGATTTGAT	RT-qPCR
<i>rpoD</i> F	ACAAGATCCGCAAGGTACTGAAG	RT-qPCR
<i>rpoD</i> R	CGCCCAGGTGCGAATC	RT-qPCR
<i>rpsL</i> F	TACACCACCACGCCGAAAA	RT-qPCR
<i>rpsL</i> R	CACCACCGATGTACGAGGAA	RT-qPCR
<i>uvrD</i> F	CTACGGTAGCGAGACCTACAACAA	RT-qPCR
<i>uvrD</i> R	GCGGCTGACGGTATTGGA	RT-qPCR
<i>mcherry</i> F	CAACGTCAACATCAAGTTGGACAT	RT-qPCR
<i>mcherry</i> R	CGTACTGTTCCACGATGGTGTAG	RT-qPCR
<i>pfeA</i> F	GCCGAGACCAGCGTGAAC	RT-qPCR
<i>pfeA</i> R	GGCCGGATTTCGATCTTGTT	RT-qPCR
<i>foxA</i> F	AAGGGCTCGGATACCCAGTT	RT-qPCR
<i>foxA</i> R	CGTTGGGATCGTGTGCA	RT-qPCR

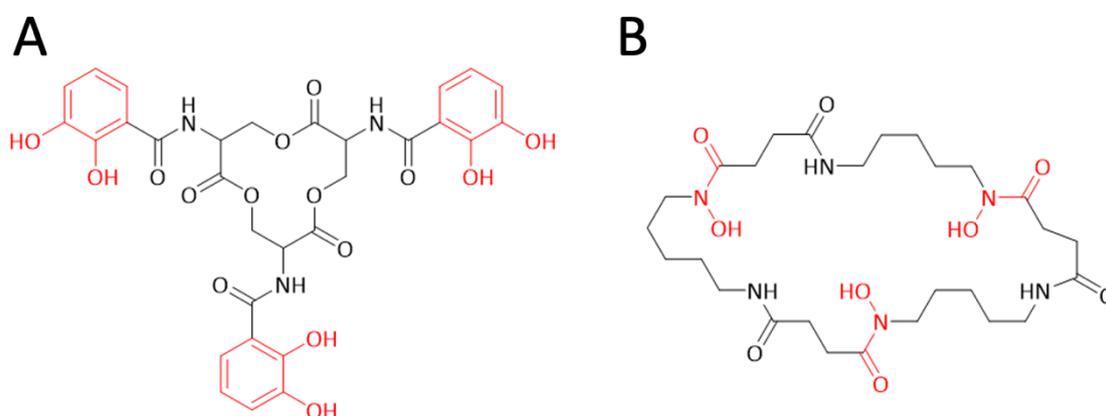


Figure S1. Structure of enterobactin (ENT) (A) and nocardamine (NOCA) (B). Chelating functions are shown in red.

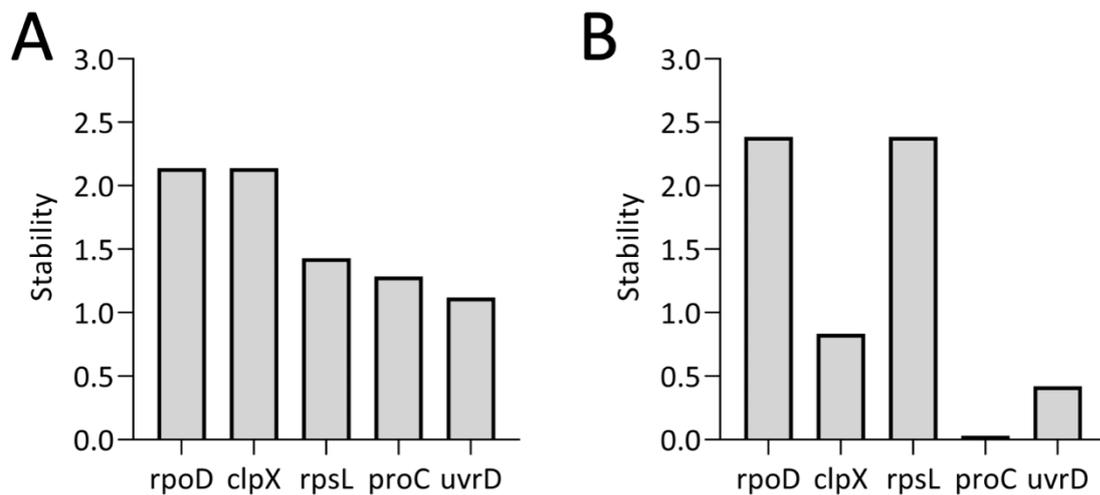


Figure S2. Reference gene stability plot. *prompfeA*-mCherry was grown in the absence or presence of 0.1, 1, or 10 μ M ENT (A) and *promfoxA*-mCherry in the absence or presence of 1, 10, or 100 μ M NOCA. In all cultures, the transcription of *rpoD*, *clpX*, *rpsL*, *proC*, and *uvrD* was followed by RT-qPCR. Previous studies have shown the expression of these genes to be stable in *P. aeruginosa*.²⁻⁶ A gene can be considered as a reference gene for the experiments when its stability over the conditions tested is above 0.5. The results are expressed as the ratio of the values obtained for *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry grown in the absence or presence of the siderophores. Biological triplicates were carried out and the data were analyzed as described by Vandesompele *et al.*⁷ *rpoD* and *clpX* were selected as reference genes for all RT-qPCR analyses presented in this study.

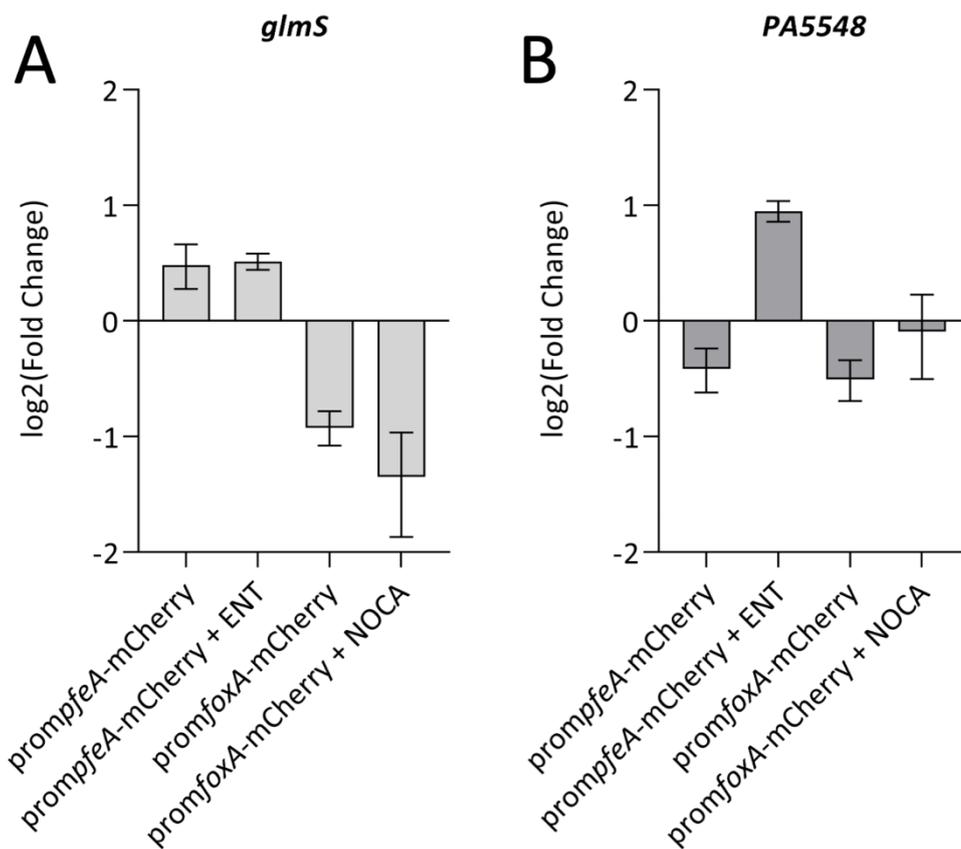


Figure S3. RT-qPCR on *glmS* (A) and *PA5548* (B) genes. PAO1 was grown for 8 h in the absence of siderophores. *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry strains were grown for 8 h in the absence or presence of 10 μ M ENT or 100 μ M NOCA, respectively. In all cultures, the transcription of *glmS* and *PA5548* was followed by RT-qPCR. The results are expressed as the ratio of the values obtained for *prompfeA*-mCherry and *promfoxA*-mCherry grown in the absence or presence of the siderophores compared to those of PAO1 (grown in the absence of siderophores). Biological triplicates were carried out. The error bars represent the standard deviations calculated by CFX Maestro™ Software (Bio-Rad). The reference genes used were *clpX* and *rpoD*.

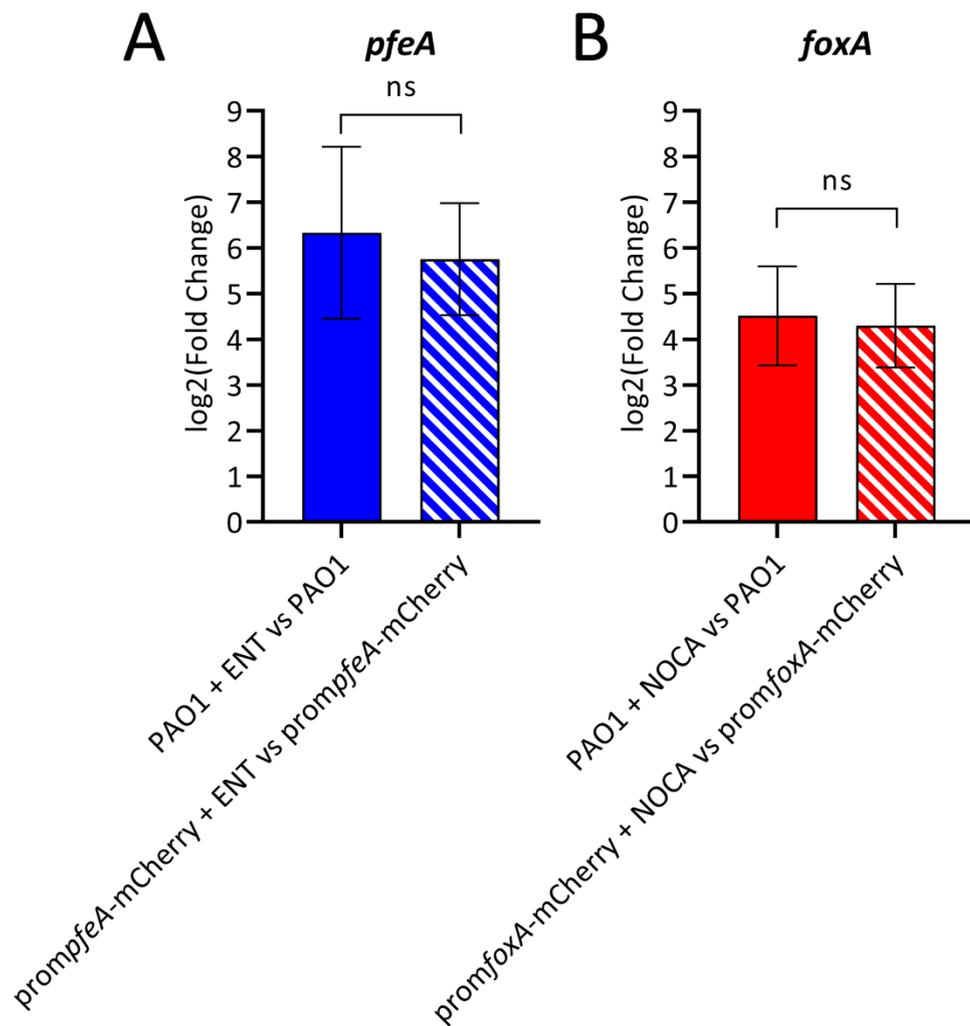


Figure S4. RT-qPCR to verify whether the insertion in the genome of a second promoter modifies the transcription levels of *pfeA* and *foxA*. (A) PAO1 and *prompfeA*-mCherry strains were grown for 8 h in the absence or presence of 10 μ M ENT. The transcription of *mCherry* and *pfeA* was followed by RT-qPCR. (B) PAO1 and *promfoxA*-mCherry were grown in the presence of 100 μ M NOCA. The transcription of *mCherry* and *foxA* was followed by RT-qPCR. The results are expressed as the ratio of values obtained with the siderophores to those obtained without for both assays. Biological triplicates were carried out. The error bars represent the standard deviations calculated by CFX Maestro™ Software (Bio-Rad). The reference genes used were *clpX* and *rpoD*.

References:

1. Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–64 (2000).
2. Savli, H. *et al.* Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol* **52**, 403–408 (2003).
3. Konings, A. F. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* uses multiple pathways to acquire iron during chronic infection in cystic fibrosis lungs. *Infect Immun* **81**, 2697–2704 (2013).
4. Alqarni, B. *et al.* Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* **127**, 182–187 (2016).
5. Ahmed, S. A. K. S. *et al.* Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 3521–3535 (2019).
6. Perraud, Q. *et al.* Phenotypic Adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Mol. Cell Proteomics* **19**, 589–607 (2020).
7. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, research0034.1 (2002).

Chapitre III :

Expression de PfeA, FoxA, FpvA et FptA en présence d'un exosidérophore seul, d'un mélange d'exosidérophores et d'un surnageant de culture de bactéries productrices de sidérophores

1 Expression de PfeA et FoxA en présence d'un mélange d'ENT et NOCA

Après avoir suivi l'expression de *pfeA* et de *foxA* en présence de gradients de concentrations d'ENT et de NOCA respectivement, nous avons souhaité étudier l'expression de ces deux gènes en présence d'un mélange de ces deux sidérophores. Selon le même protocole que les expériences avec le gradient de concentration d'un seul sidérophore, les souches *prompfeA-mCherry* et *promfoxA-mCherry* ont été cultivées en présence de concentrations d'ENT et de NOCA à différents ratios (ENT de 0,1 à 100 μM et NOCA de 1 μM à 100 μM). La $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ et la fluorescence à 610 nm de mCherry (excitation à 570 nm) ont été suivies. Les signaux de fluorescence de chaque condition ont été modélisés et ont permis de calculer les taux de production de mCherry, β , comme présenté au chapitre précédent. Ces valeurs de production sont présentées Figure 61 sous la forme d'un graphique avec des courbes de niveaux pour chacune des deux souches.

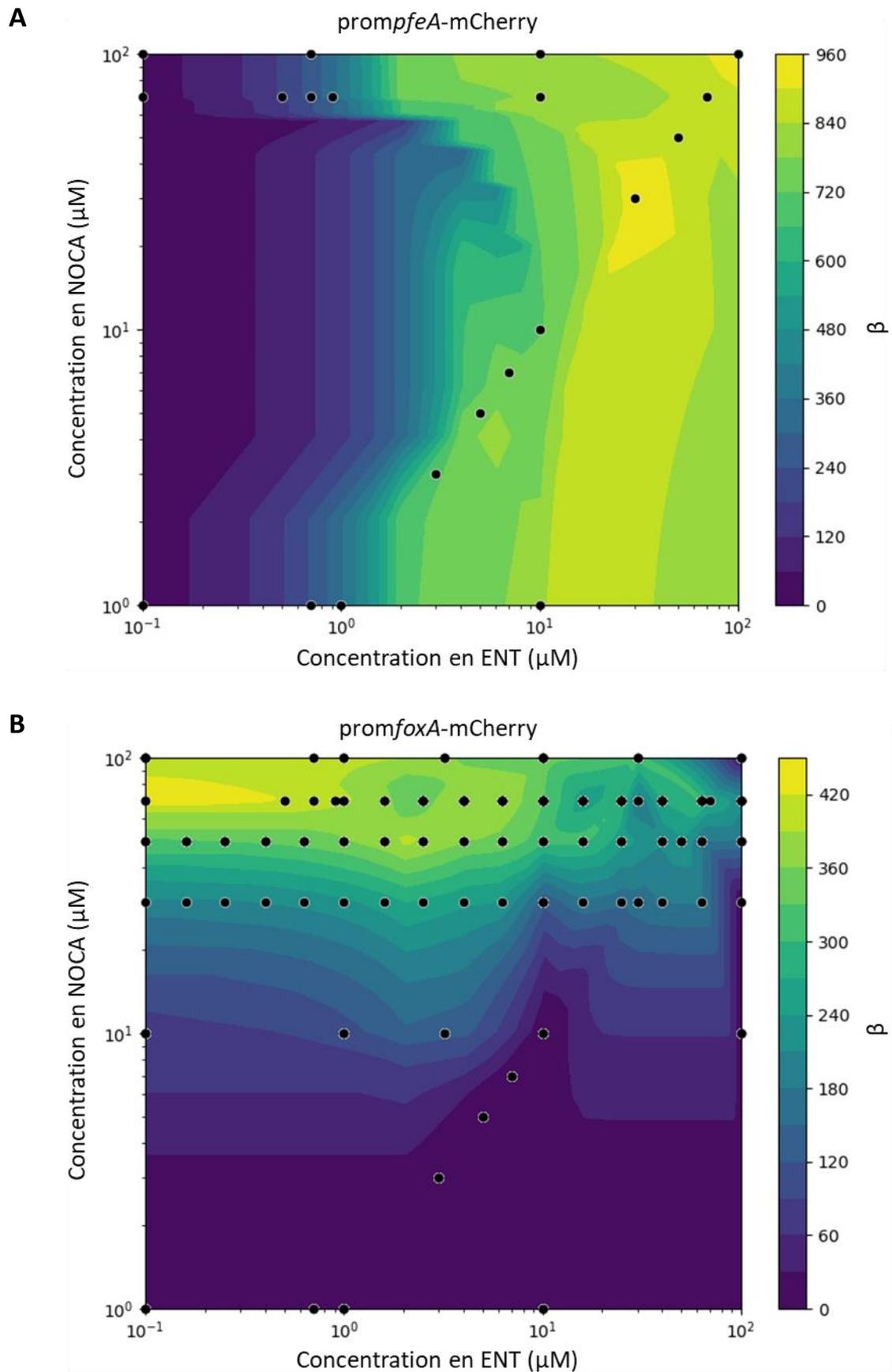


Figure 61 : Valeurs β trouvées en cultivant *prompfeA-mCherry* et *promfoxA-mCherry* en présence d'un mélange d'ENT et de NOCA. Les souches *prompfeA-mCherry* (A) et *promfoxA-mCherry* (B) ont été

cultivées pendant 24 h dans un milieu CAA en présence de concentrations allant de 0,1 à 100 μM pour l'ENT et de 1 à 100 μM pour la NOCA, avec 20 ratios ENT:NOCA pour *prompfeA*-mCherry (A) et 70 ratios pour *promfoxA*-mCherry (B). Chaque courbe de niveau représente une valeur de β selon l'échelle de couleurs en légende. Chaque condition a été réalisée avec des triplicats biologiques et est représentée par un point noir sur le graphique. Les graphiques avec courbes de niveaux ont été générés sur Python par interpolation multidimensionnelle linéaire à partir des données grâce aux fonctions `scipy.interpolate.griddata(method='linear')` et `matplotlib.pyplot.contourf`.

Pour la souche *prompfeA*-mCherry (Figure 61A), l'augmentation de la concentration d'ENT entraîne une augmentation similaire de β , c'est-à-dire de la production de mCherry, que la concentration de NOCA soit de 1 ou de 100 μM . Cette observation, nous permet de conclure que la présence de NOCA n'influence pas l'expression génétique de *pfeA*, qui reste strictement dépendante de la concentration d'ENT. En revanche, pour la souche *promfoxA*-mCherry, nous avons observé une réduction progressive de β , c'est-à-dire de la production de mCherry en fonction de l'augmentation de la concentration d'ENT, même pour de fortes concentrations de NOCA (Figure 61B). Ce constat indique que la présence d'ENT affecte l'expression génétique de *foxA*, et cet effet semble se manifester à partir d'1 μM d'ENT. Afin d'étudier cette diminution d'expression de *mCherry*, et donc de *foxA*, due à la présence d'ENT, nous avons étudié les mélanges avec des concentrations constantes de NOCA (30, 50 ou 70 μM) et une concentration croissante d'ENT (gradient de 0,1 à 100 μM). Les résultats de ces expériences sont représentés par des lignes horizontales de points sur la Figure 61B et sous forme de graphique sur la Figure 62.

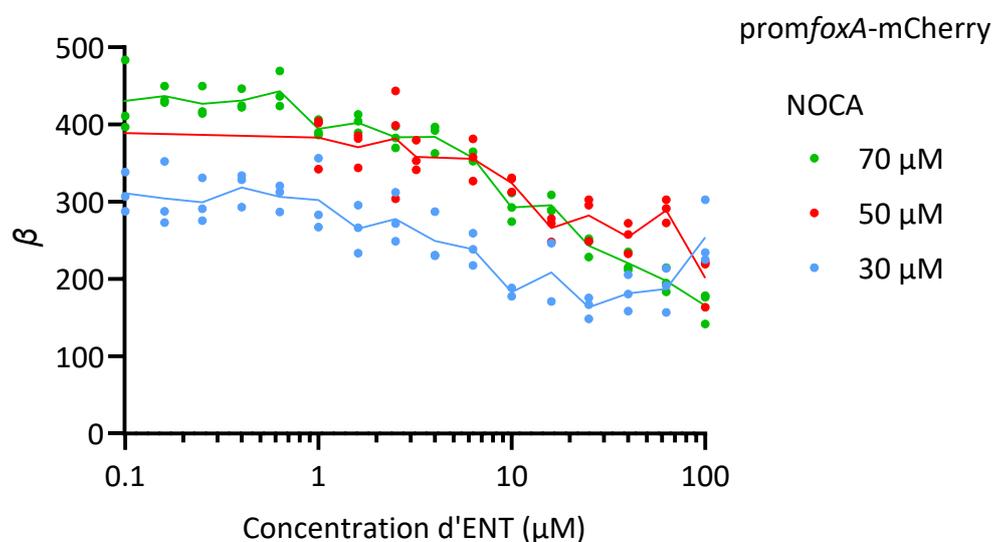


Figure 62 : Valeurs β de la souche *promfoxA*-mCherry cultivée avec des mélanges de NOCA (30, 50 ou 70 μM) et d'ENT (gradient de 0,1 à 100 μM). Les données obtenues avec 70 μM de NOCA sont en vert, avec 50 μM en rouge et avec 30 μM en bleu. Chaque condition a été réalisée avec des triplicats

biologiques. Chaque point représente un triplicat et chaque courbe représente la moyenne des trois triplicats.

Que ce soit en présence de mélanges contenant 30, 50 ou 70 μM de NOCA, nous observons une réduction d'environ 50 % de la production de mCherry entre les conditions à 1 μM et 100 μM d'ENT (Figure 62). Cette tendance est particulièrement évidente pour les mélanges avec 50 et 70 μM de NOCA. Cependant, les valeurs β obtenues avec une concentration autour de 100 μM d'ENT dans les mélanges contenant 30 μM de NOCA sont anormalement élevées, ce qui rend difficile l'interprétation et la généralisation de ces observations.

Nous avons tenté d'utiliser la modélisation mathématique pour caractériser la diminution de la production de mCherry en présence de concentrations croissantes d'ENT pour la souche *promfoxA-mCherry*. Cependant, en raison d'une importante erreur intrinsèque associée à nos expériences, il est difficile d'établir une équation mathématique précise dans le cadre de nos modèles existants. Nous pouvons formuler l'hypothèse que la production de mCherry, c'est-à-dire de FoxA, va retrouver un niveau basal à de grandes concentrations d'ENT peu importe la concentration de NOCA. La production de FoxA à une concentration donnée de NOCA et en fonction des concentrations croissantes d'ENT pourrait suivre une allure sigmoïdale pouvant être décrite par une équation de Hill. Toutefois, notre méthode ne nous permet pas d'obtenir des données au-delà de 100 μM de sidérophore, car l'ENT ou la NOCA précipite dans ces conditions. Nous disposons de données insuffisantes pour élaborer un modèle mathématique précis et complet dans notre système expérimental actuel.

En conclusion, cette étude de l'effet d'un mélange d'ENT et de NOCA sur l'expression de *pfeA* et *foxA* a montré que la présence de NOCA n'affectait pas l'expression de *pfeA* qui reste strictement fonction de la concentration d'ENT. En revanche, l'expression de *foxA* avec les différentes concentrations de NOCA testées est affectée par la présence d'ENT qui tend à diminuer son expression au-delà de 1 μM d'ENT.

2 Expression de PfeA et FoxA en présence de PROTO et DFOB

Ayant caractérisé l'expression de *pfeA* en présence d'un gradient de concentrations d'ENT, et de *foxA* en présence d'un gradient de concentrations de NOCA, nous avons étudié l'effet d'autres

exosidérophores reconnus et transportés par ces deux TBDT pour élargir notre compréhension de la régulation génétique de l'expression de ces deux gènes. L'objectif était d'identifier si la régulation de l'expression de ces deux protéines, et donc des voies d'import auxquelles ils appartiennent, était dépendante ou non du sidérophore transporté. Pour se faire, nous avons testé la PROTO, un sidérophore avec trois fonctions catéchols qui, lorsqu'il est complexé au fer ferrique, est transporté par PfeA (Gasser *et al.*, 2016), et la DFOB, un sidérophore avec trois fonctions hydroxamates qui importe le fer par FoxA (Normant *et al.*, 2020). De la même manière que pour les expériences présentées dans le chapitre précédent, la souche *prompfeA-mCherry* a été cultivée en présence d'un gradient de concentrations de PROTO et la souche *promfoxA-mCherry* en présence d'un gradient de concentrations de DFOB. Pour les deux sidérophores, un gradient de concentrations allant de 0,001 à 100 μM a été testé. Pour chaque souche et pour chaque condition, la $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ et la fluorescence de mCherry ont été mesurées. Le signal de fluorescence a été calculé pour chaque concentration de sidérophore et modélisé afin d'obtenir les valeurs de β . Cette fluorescence est représentative de l'expression de PfeA ou FoxA selon la souche rapportrice utilisée *prompfeA-mCherry* ou *promfoxA-mCherry*.

2.1 Expression de PfeA en présence d'un gradient de concentrations de PROTO

Pour comparer l'expression de *pfeA* en présence d'ENT ou de PROTO, les valeurs de β obtenues avec le gradient de concentrations d'ENT sont comparées à celles obtenues avec le gradient de concentrations de PROTO, comme illustré dans la Figure 63. La modélisation des données obtenues avec la PROTO révèle un schéma d'expression de *pfeA* en fonction de la concentration qui est sigmoïdal, comme celui observé avec l'ENT, et peut être représenté par l'équation de Hill. Cependant, les paramètres de l'équation de Hill qui modélisent les données de PROTO montrent que l'expression maximale de *pfeA* est environ deux fois plus faible qu'en présence d'ENT. Bien que les coefficients de Hill n soient similaires entre les deux modèles, la valeur de K est cent fois plus basse avec la PROTO par rapport à l'ENT. En présence de PROTO, l'expression de *pfeA* va être activée et arriver à son maximum à des concentrations plus faibles que pour l'ENT : l'expression démarre à 0,001 μM avec la PROTO et à 0,1 μM avec l'ENT et elle arrive à son maximum à 0,03 μM de PROTO et à 3 μM d'ENT. La réponse d'expression est de type sigmoïde, mais elle est plus sensible, se fait pour des concentrations cent fois plus faibles de sidérophore. Ces résultats mettent en évidence une régulation différente de l'expression de *pfeA* en fonction de la nature du sidérophore, même si la PROTO et l'ENT ont une structure proche. Cette différence d'expression peut s'expliquer par les interactions spécifiques entre les sidérophores et le transporteur PfeA, les complexes ENT-Fe et PROTO-Fe n'ont peut-être pas la même affinité pour les sites de liaison sur PfeA. De plus, les interactions dans le périplasme entre le

sidérophore et le senseur PfeS ainsi que la reconnaissance et l'hydrolyse de PfeE avec le complexe sidérophore-Fe peuvent également contribuer à cette régulation différenciée selon la nature du sidérophore.

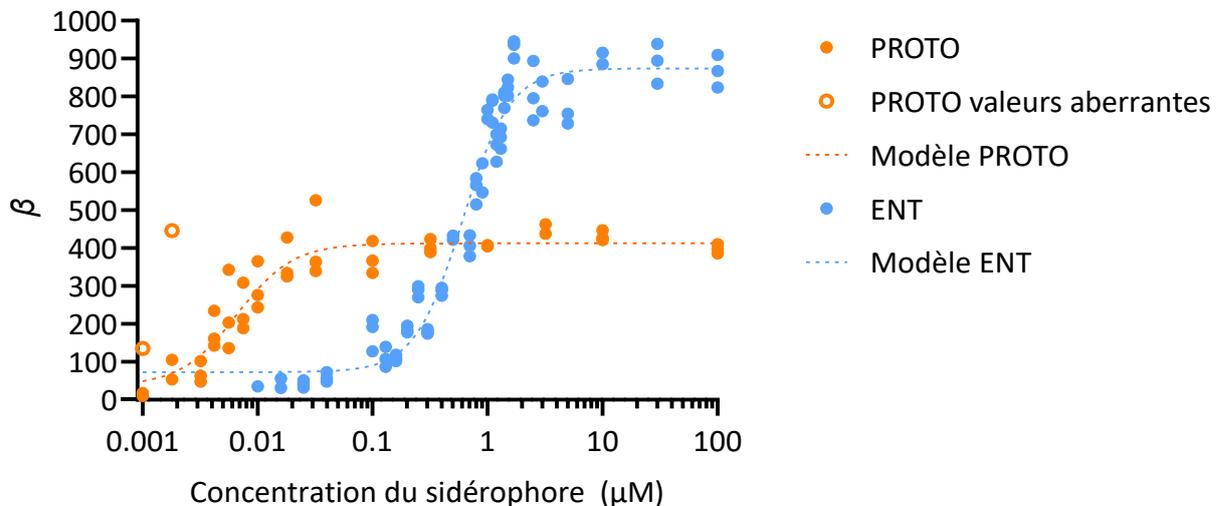


Figure 63 : Taux de production de mCherry (β) pour la souche *prompfeA-mCherry* en fonction de gradients de concentrations de PROTO et ENT. Les valeurs β sont tracées en fonction de la concentration d'ENT (points bleus) ou de PROTO (points orange, les valeurs aberrantes sont représentées par des cercles orange). La courbe sigmoïde ajustée avec l'équation de Hill (17) sur chaque jeu de données est représentée par une ligne en pointillés (bleue pour le modèle avec de l'ENT, orange pour le modèle avec de la PROTO) et les paramètres obtenus pour chaque modèle sont : $y_0 = 73,075$, $y_{max} = 874,074$, $n = 2,103$, $K = 0,606 \mu\text{M}$ pour le modèle avec de l'ENT et $y_0 = 36,208$, $y_{max} = 412,598$, $n = 1,781$, $K = 0,007 \mu\text{M}$ pour le modèle avec de la PROTO. Les valeurs aberrantes n'ont pas été prises en compte pour la modélisation.

2.2 Expression de FoxA en présence d'un gradient de concentration de DFOB

De la même manière que nous avons comparé l'expression de *pfeA* selon la présence d'ENT ou de PROTO, nous avons comparé l'expression de *foxA* en présence de NOCA ou de DFOB. Les valeurs de β obtenues avec un gradient de concentrations de chaque sidérophore sont représentées dans la Figure 64. L'analyse des données révèle que l'expression de *foxA* est modélisable par une équation linéaire en fonction de la concentration logarithmique en DFOB, tout comme avec la NOCA. Cependant, l'augmentation de l'activité du promoteur de *foxA* est plus progressive et débute à des concentrations très faibles de DFOB, environ 0,1 nM, tandis qu'elle débute vers 0,5 μM avec la NOCA. La pente des droites modélisant les deux ensembles de données diffère, avec une pente plus de deux fois plus prononcée avec la NOCA par rapport à la DFOB. À fortes concentrations, les deux droites convergent : l'expression de *foxA* semble être similaire à 100 μM pour les deux sidérophores. Ces résultats indiquent que l'expression de *foxA* diffère selon la nature du sidérophore, malgré la similitude structurelle entre

la NOCA et la DFOB. Cette différence peut s'expliquer par l'affinité distincte des complexes sidérophores-Fe pour le site de liaison sur FoxA. Dans cette voie d'acquisition du fer, la régulation est assurée par un système à facteur σ et anti- σ , où l'activation de la régulation dépend de la liaison complexe sidérophore-Fe à FoxA et de son transport. La différence d'expression laisse suggérer que l'affinité pour le site de liaison sur FoxA et/ou la dynamique du transport peut varier en fonction de la nature du sidérophore et impacter la régulation de l'expression de *foxA*.

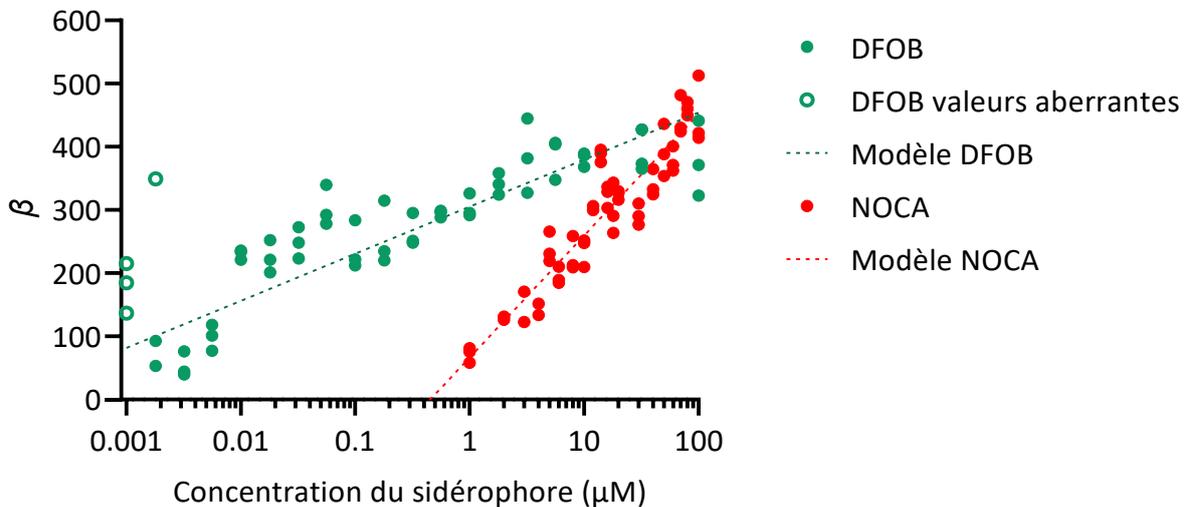


Figure 64 : Taux de production de mCherry (β) de la souche *promfoxA-mCherry* selon des gradients de concentration de différents sidérophores hydroxamates. Les valeurs β sont tracées en fonction de la concentration de NOCA (points rouges) ou de DFOB (points verts, les valeurs aberrantes sont représentées par des cercles verts). La droite ajustée avec l'équation logarithmique (19) sur chaque jeu de données est représentée par une ligne en pointillés (rouge pour le modèle avec de la NOCA, vert pour le modèle avec de la DFOB) et les paramètres obtenus pour chaque modèle sont : $a = 192,935$, $x_e = 0,452 \mu\text{M}$ pour le modèle avec de la NOCA et : $a = 74,559$, $x_e = 0,08 \text{ nM}$ pour le modèle avec de la DFOB. Les valeurs aberrantes n'ont pas été prises en compte pour la modélisation.

L'expression du gène codant pour un TBDT a été comparée en présence de deux sidérophores différents, tous deux transportables par ce TBDT. Les résultats ont révélé une régulation distincte de l'expression des transporteurs en fonction du sidérophore. Les interactions spécifiques entre les sidérophores et les transporteurs, ainsi que la dynamique du transport et les interactions avec les autres protéines de la voie d'acquisition, semblent jouer un rôle clé dans cette régulation. Ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte la diversité des sidérophores dans l'étude de la régulation génétique des voies d'acquisition.

3 Expression de FpvA et FptA en présence d'ENT ou de NOCA

Après l'étude de la dynamique de l'expression génétique des TBDT PfeA et FoxA en fonction de la concentration de sidérophores présents dans l'environnement de *P. aeruginosa*, nous avons également étudié l'effet de concentrations croissantes d'ENT et NOCA sur l'expression des TBDT des voies d'acquisition du fer par les sidérophores endogènes de *P. aeruginosa* (PVDI et PCH). Dans l'équipe, nous avons déjà montré que la présence d'ENT à une concentration de 2 ou 10 μM dans un milieu de culture carencé en fer de *P. aeruginosa* entraîne une répression de l'expression des gènes de la voie d'acquisition du fer par la PCH, sans avoir d'effet sur l'expression des gènes de la voie de synthèse et d'acquisition du fer par la PVDI (Gasser *et al.*, 2016; Perraud *et al.*, 2020b). La répression de l'expression des gènes de la voie d'acquisition du fer par la PCH a aussi lieu en présence de NOCA à une concentration de 10 μM sans que l'expression des gènes de la voie d'acquisition du fer par la PVDI ne soit affectée (Normant *et al.*, 2022). Ces observations ont été faites grâce à des approches d'analyses protéomiques et de qRT-PCR, sur des cultures de *P. aeruginosa* de 8 h. L'expression des gènes a été étudiée à un temps unique. Pour étudier l'expression des gènes en continu au cours de la croissance bactérienne, deux autres rapporteurs fluorescents ont été construits selon la même méthodologie décrite précédemment, avec les régions promotrices de *fpvA* et *fptA*, gènes codant pour les TBDT des complexes PVDI-Fe et PCH-Fe respectivement.

3.1 Construction des souches rapportrices *promfpvA*-YPet et *promfptA*-YPet

Pour optimiser les constructions et notre méthode d'analyse, nous avons choisi d'utiliser YPet, protéine fluorescente jaune, et qui a un meilleur rendement de fluorescence que mCherry (rendement de fluorescence de 80,08 pour YPet et de 15,84 pour mCherry (<https://www.fpbases.org/>)). Ces constructions sont appelées *promfpvA*-YPet et *promfptA*-YPet.

Pour vérifier que l'expression génétique du rapporteur fluorescent soit en corrélation avec le gène qu'il rapporte, les constructions *promfpvA*-YPet et *promfptA*-YPet ont été cultivées en milieu carencé en fer durant 8 h en absence ou en présence de 1, 3,2 et 10 μM d'ENT ou de NOCA. Des analyses par qRT-PCR ont été faites sur ces cultures sur les gènes *pfeA*, *foxA*, *fpvA*, *fptA* et YPet (Figure 65 et 66). Pour la construction *promfpvA*-YPet, une induction de l'expression des gènes *pfeA* et *foxA* est détectée comme attendu, mais aucune différence de transcription n'est observée pour *fpvA* et YPet. Ces résultats confirment que la transcription de YPet est bien corrélée à celle de *fpvA* en présence d'ENT (Figure 65A) ou de NOCA (Figure 65B), validant la construction de fusion de promoteur. La construction *promfpvA*-YPet peut être utilisée pour suivre par fluorescence l'expression de *fpvA*.

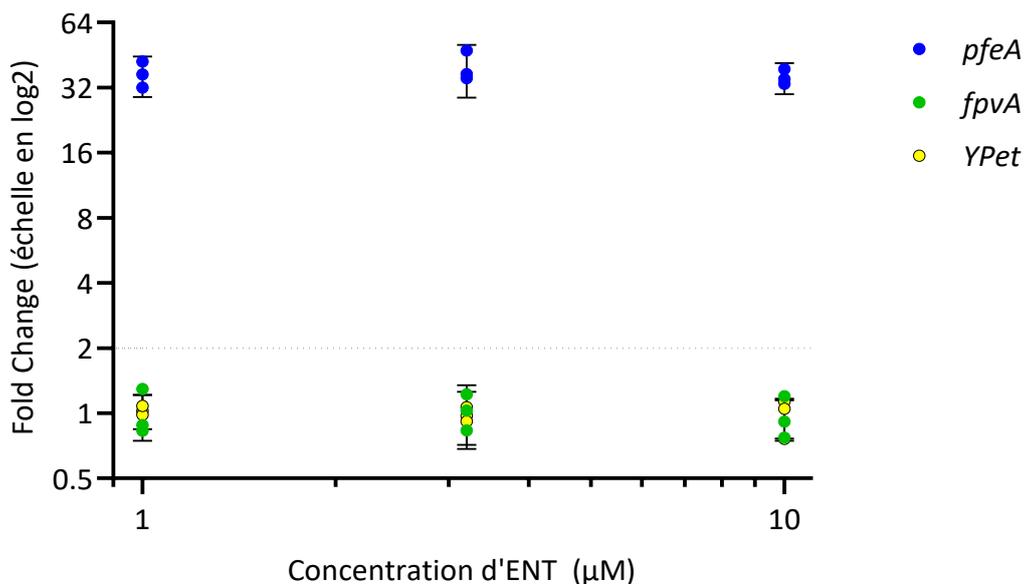
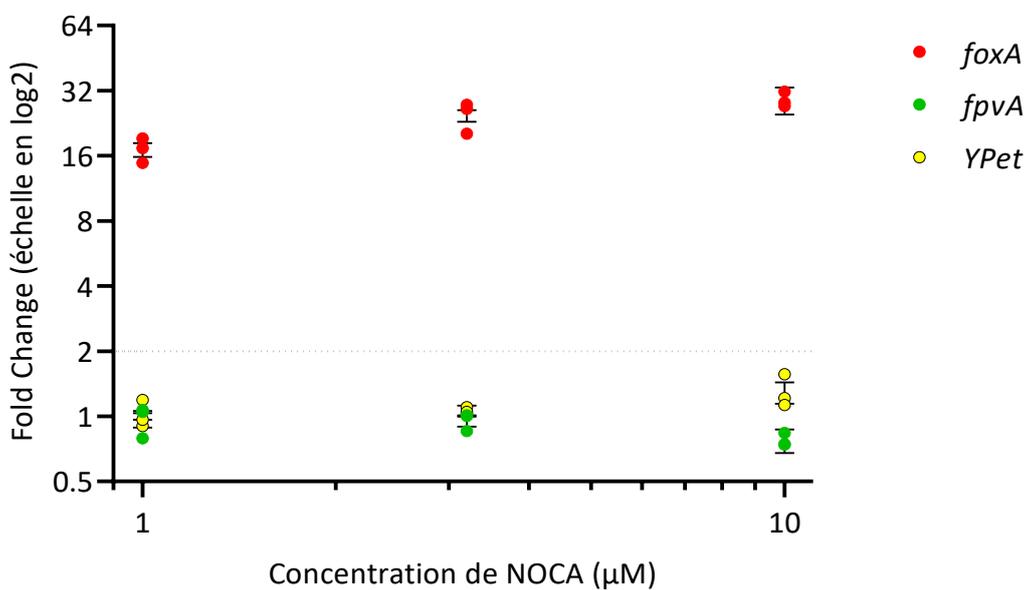
A**B**

Figure 65 : Analyse de la transcription de *pfeA*, *foxA*, *fpvA* et *YPet* pour la souche *promfpvA*-*YPet* en présence d'ENT ou de NOCA. La souche *promfpvA*-*YPet* a été cultivée pendant 8 h dans un milieu CAA en absence ou en présence de concentrations de 1, 3,2 et 10 µM d'ENT (A) ou de NOCA (B). La transcription de *pfeA* (points bleus), de *foxA* (points rouges), de *fpvA* (points verts) et de *YPet* (points jaunes) a été analysée. Les résultats sont exprimés en Fold Change entre les conditions en présence de sidérophores par rapport à celles obtenues en leur absence. Pour chaque concentration d'ENT ou de NOCA, des triplicats biologiques ont été réalisés. Les barres d'erreur représentent les erreurs standard calculées par le logiciel CFX Maestro™ (Bio-Rad). Le seuil de significativité à Fold Change = 2 est indiqué

par des pointillés (une surexpression est significative uniquement si les données de Fold Change sont strictement supérieures à 2). Les gènes de référence utilisés sont *clpX* et *rpoD*.

Pour la construction *promfptA*-YPet, une induction de la transcription de *pfeA* et *foxA* a été observée en présence d'ENT (Figure 66A) et de NOCA (Figure 66B) comme attendu. En parallèle, une répression de la transcription des gènes *fptA* et de *YPet* a été observée avec une concentration d'ENT à 10 µM (Figure 66A). Mise à part pour cette condition, aucune différence significative de la transcription de ces deux gènes n'a été observée, que ce soit en présence d'ENT comme de NOCA. La transcription de *YPet* et celle de *fptA* semblent être bien corrélées, les Fold Change calculés pour ces deux gènes sont très proches pour toutes les conditions testées, validant ainsi la construction de fusion de ce promoteur. La construction *promfptA*-YPet peut être utilisée pour suivre par fluorescence l'expression de *fptA*.

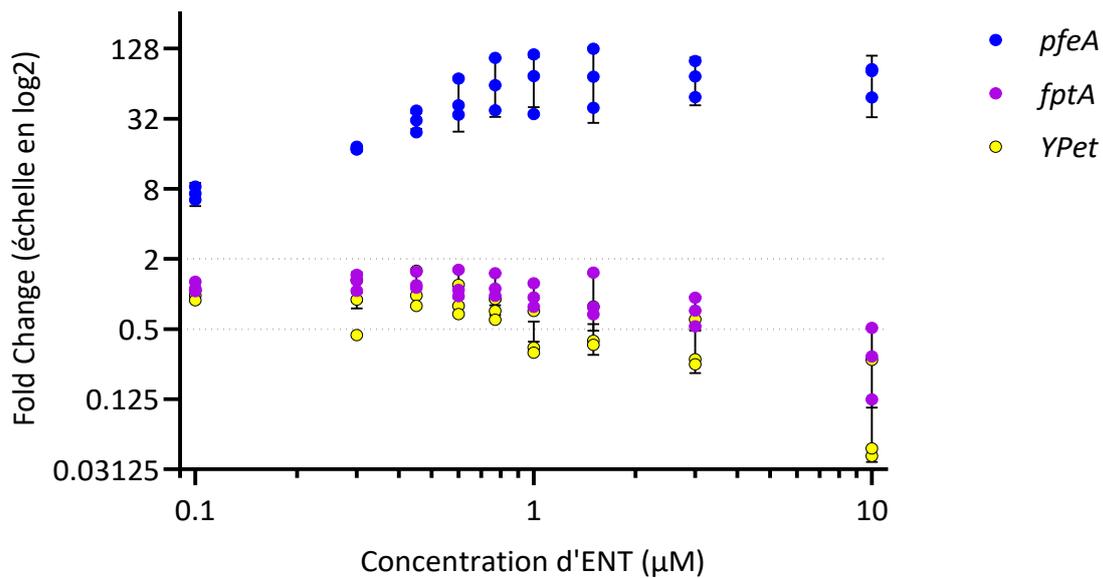
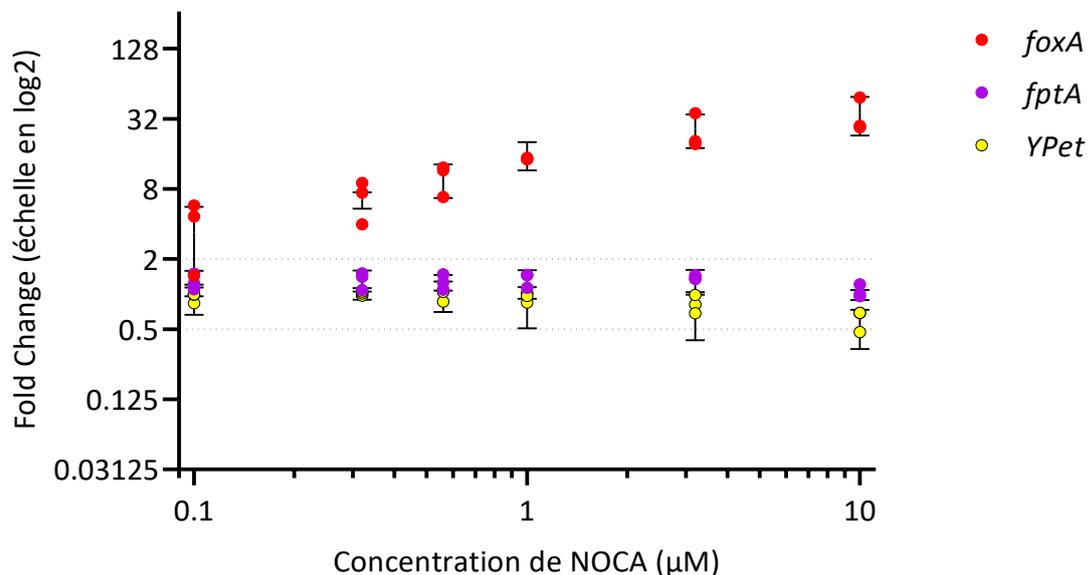
A**B**

Figure 66 : Analyse de la transcription de *pfeA*, *foxA*, *fptA* et *YPet* pour la souche *promfptA*-*YPet* en présence d'ENT ou de NOCA. La souche *promfptA*-*YPet* a été cultivée pendant 8 h dans le milieu CAA en absence ou en présence de concentrations de 0,1 à 10 µM d'ENT (A) ou de NOCA (B). La transcription de *pfeA* (points bleus), de *foxA* (points rouges), de *fptA* (points violets) et de *YPet* (points jaunes) a été analysée. Les résultats sont exprimés en Fold Change entre les conditions en présence de sidérophores par rapport à celles obtenues en leur absence. Pour chaque concentration d'ENT ou de NOCA, des triplicats biologiques ont été réalisés. Les barres d'erreur représentent les erreurs standard calculées par le logiciel CFX Maestro™ (Bio-Rad). Les seuils de significativité à Fold Change = 2 et Fold Change = 0,5 sont indiqués par des pointillés (une surexpression et une répression sont significatives).

uniquement si les données de Fold Change sont respectivement strictement supérieures à 2 ou strictement inférieures à 0,5). Les gènes de référence utilisés étaient *clpX* et *rpoD*.

3.2 Analyse de l'expression génétique de *fpvA* en présence d'un gradient de concentrations d'ENT ou de NOCA avec la souche *promfpvA*-YPet

3.2.1 Suivi de croissance, de production de PVDI et de fluorescence de YPet

La souche *promfpvA*-YPet a été cultivée en présence de gradients de concentrations d'ENT ou de NOCA. Pour étudier l'impact de la présence de ces sidérophores sur la culture des bactéries, la croissance a été suivie en mesurant la $DO_{600\text{ nm}}$ (Figure 67A). La PVDI est un sidérophore composé d'une partie peptidique liée à un chromophore de type dihydroxyquinoline qui a une absorbance caractéristique à 400 nm. La production de PVDI par la souche *promfpvA*-YPet a pu être suivie en mesurant l'absorbance à 400 nm (Budzikiewicz, 2004) et en la rapportant à la $DO_{600\text{ nm}}$ pour chaque condition (2) (Figure 67B). Les résultats ont montré que, même avec de fortes concentrations d'ENT ou de NOCA, la production de PVDI n'était pas affectée par rapport à la condition de culture sans ENT ou NOCA. La biosynthèse de PVDI ne semble pas être impactée par la présence de NOCA ou ENT.

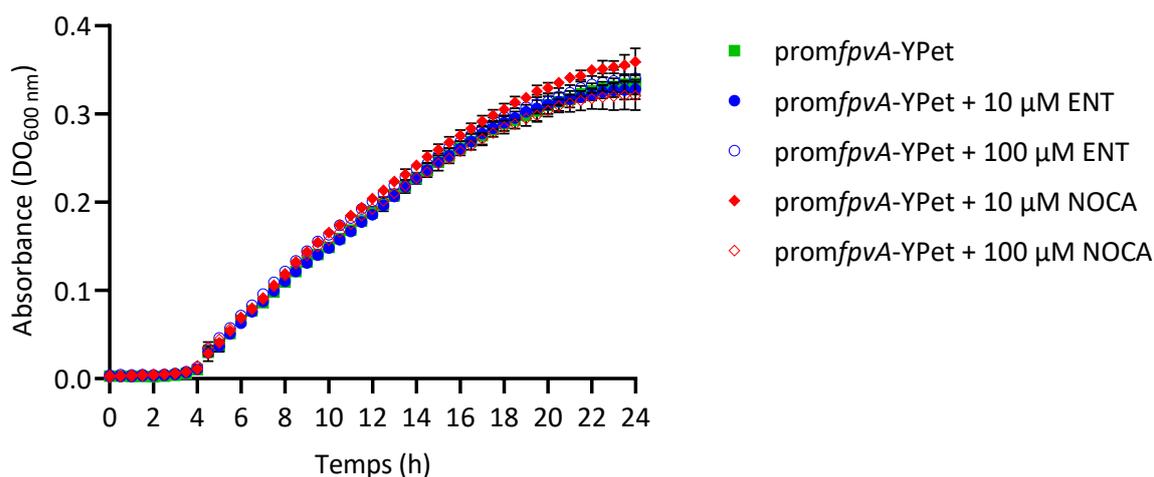
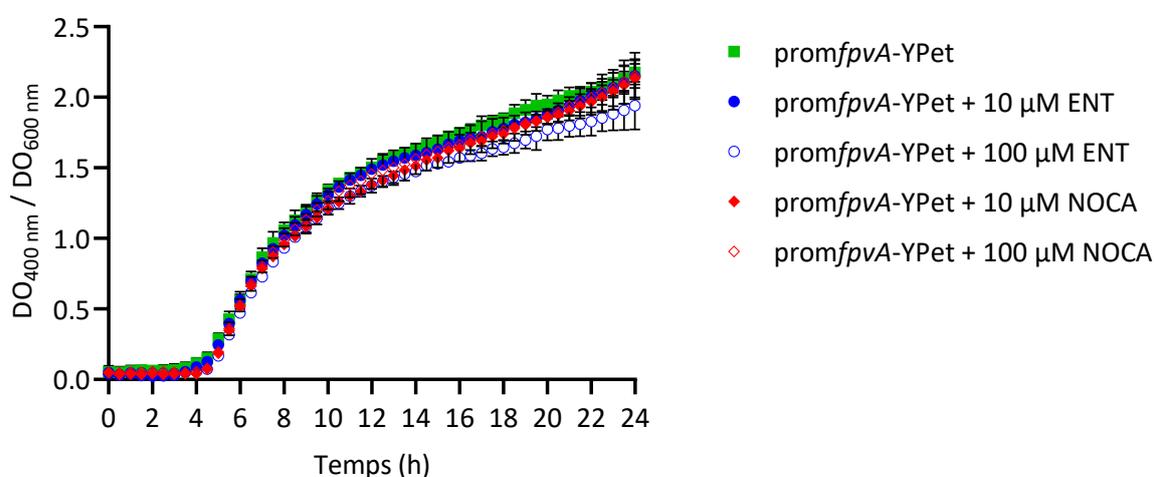
A**B**

Figure 67 : Suivi de croissance et de production de PVDI de la souche *promfpvA*-YPet. La souche *promfpvA*-YPet a été cultivée en milieu CAA en absence et présence d'ENT ou de NOCA à des concentrations de 10 ou 100 μM. Les conditions de culture en présence d'ENT ou de NOCA sont comparées à la condition témoin sans ajout de sidérophore. (A) La DO_{600 nm} a été mesurée pour suivre la croissance des bactéries. (B) La DO_{400 nm} a été mesurée et rapportée à la DO_{600 nm} (2) pour déterminer le taux de production de PVDI par la culture.

La fluorescence de YPet a été mesurée à 540 nm (excitation à 500 nm) (Figure 68). Contrairement aux résultats obtenus avec les souches *prompfeA*-mCherry et *promfoxA*-mCh, la souche *promfpvA*-YPet est déjà fluorescente dans la condition sans ENT ou NOCA. En effet, dans un milieu carencé en fer, les gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des sidérophores PVDI et PCH et les voies d'acquisition du fer par ces deux sidérophores ont leur expression activée (Perraud *et al.*, 2020b). Ceci implique,

pour la voie d'acquisition du fer par la PVDI, une expression de *fpvA*, donc de *YPet* dans la souche *promfpvA-YPet*, et ceci se traduit par une fluorescence émise par cette souche en milieu carencé en fer. Si une baisse de fluorescence est observée, cela sera la conséquence d'une répression de l'expression des gènes impliqués dans la voie d'acquisition du fer par la PVDI. Dans cette expérience, aucune différence significative d'émission de fluorescence n'a été observée entre la culture en absence d'ENT ou de NOCA et celle en présence d'un de ces deux sidérophores pendant la phase exponentielle de croissance. En revanche, pour les conditions en présence de 10 et 100 μM d'ENT, une fluorescence différentielle positive est détectée en fin de croissance, à partir de 16 h environ, lorsque la croissance bactérienne entre en transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Figure 68A). Pour vérifier la significativité de ces différences, nous avons tracé les courbes avec les données traitées de façon à ce que la différence de fluorescence avec le témoin soit distribué entre -1 et 1, où 0 représente aucune différence avec le témoin, 1 représente une différence de 100 % avec le témoin et -1 représente une différence de -100 % avec le témoin (Figure 68B et D). De 0 à 4 h, les données sont dans le bruit de fond. Ensuite, pour l'expérience avec l'ENT (Figure 68A et B), les différences de fluorescences dans les conditions avec 10 et 100 μM d'ENT semblent être significatives qu'à partir de 18 h de culture et restent stables aux alentours des 10 %. À partir de ce temps de culture, les bactéries entrent en phase stationnaire de croissance. Cette différence observée est peut-être due à des interactions de régulation entre les différentes voies d'acquisition du fer et aux changements métaboliques de transition d'état de croissance des bactéries. Une étude de l'expression des gènes des voies d'acquisition du fer par la PVDI en fin de croissance permettrait d'élucider ce résultat. Pour l'expérience avec la NOCA (Figure 68C et D), les différences de fluorescences aux concentrations de NOCA testées ne sont que très faibles. Nous n'observons pas de différence significative de fluorescence entre les conditions testées et le témoin tout au long de la culture.

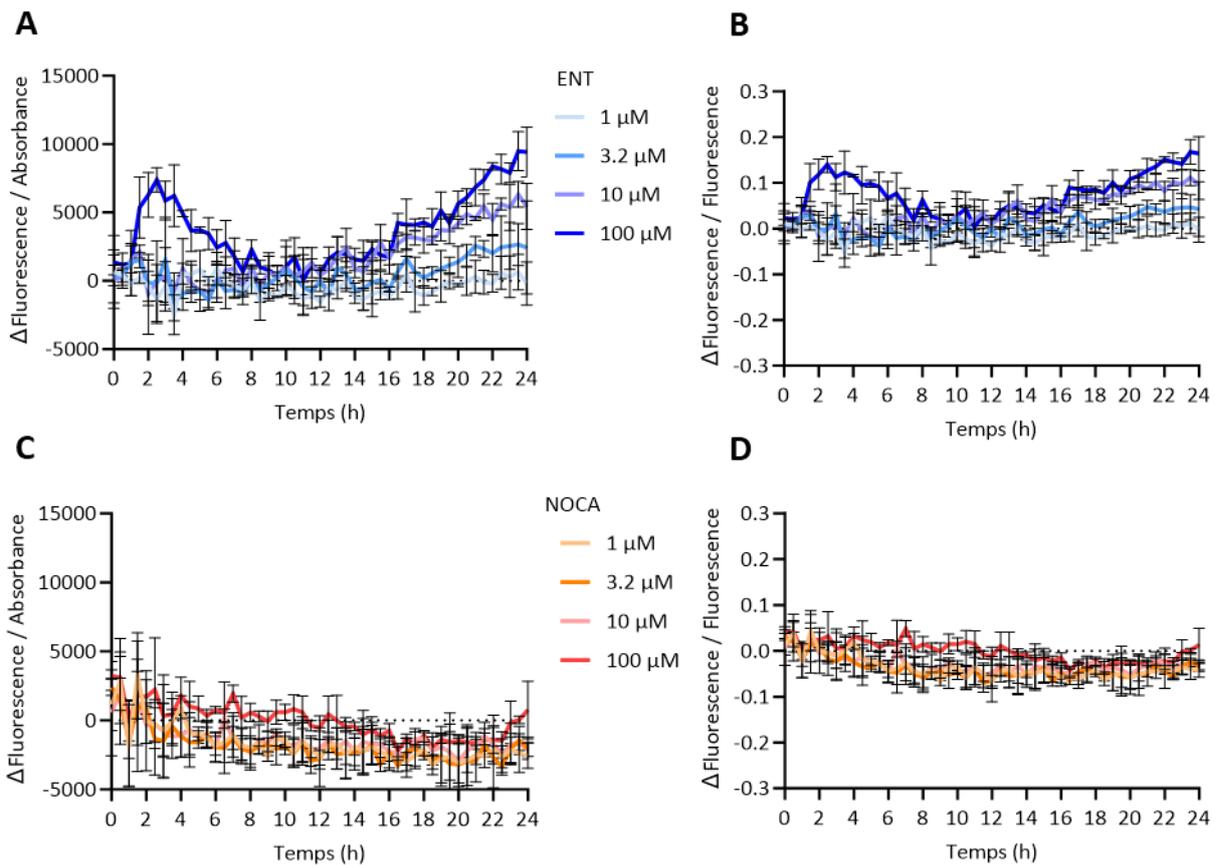


Figure 68 : Fluorescence à 540 nm de la souche *promfpvA*-YPet au cours de la croissance en présence des sidérophores ENT ou NOCA. *promfpvA*-YPet a été cultivée en milieu CAA en absence et en présence de concentrations croissantes d'ENT (A et B) ou de NOCA (B et C). Pour les deux sidérophores testés, l'absorbance a été suivie à 600 nm tout au long de la culture ainsi que la fluorescence de YPet (excitation à 500 nm et émission à 540 nm). Le signal de fluorescence a été traité avec l'équation (4) (A et C). Pour évaluer la significativité de l'écart entre la fluorescence des conditions de culture en présence de sidérophores et celle en absence, le signal de fluorescence a été traité par l'équation (3) (B et D). Trois expériences indépendantes avec trois réplicats techniques ont été réalisées pour chaque concentration testée (n=3). Les moyennes des trois données et les erreurs standards sont présentées.

En conclusion, nos données avec la souche rapportrice *promfpvA*-YPet montrent que ni l'expression de *fpvA* ni la production de la PVDI ne sont affectées par la présence d'ENT ou de NOCA dans le milieu de culture à des concentrations allant de 1 à 100 μ M.

3.3 Analyse de l'expression génétique de *fptA* en présence d'un gradient d'ENT ou de NOCA avec à la souche *promfptA*-YPet

3.3.1 Suivi de croissance et de fluorescence de YPet

La souche *promfptA*-YPet a été cultivée en milieu CAA en absence et en présence d'un gradient de concentration d'ENT ou de NOCA allant de 0,1 à 100 μM , de manière similaire à l'étude avec la souche *promfpvA*-YPet. Un suivi de la $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ et de la fluorescence a été réalisé pour évaluer l'impact de ces sidérophores sur l'expression des gènes impliqués dans la voie d'acquisition du fer par la PCH (Figure 69). Les résultats montrent que la présence d'ENT ou de NOCA entraîne une diminution de la fluorescence de YPet et que cette baisse de fluorescence s'accroît avec l'augmentation de la concentration de sidérophores. Nous constatons également que la NOCA semble réprimer l'expression de *fptA* dans une moindre mesure que l'ENT.

Pour une analyse plus approfondie des données, le taux de production de YPet (β) pour chaque condition a été caractérisé à l'aide d'une équation de production ajustée à chaque courbe de fluorescence. Les valeurs de β obtenues, représentées en fonction de la concentration d'ENT ou de NOCA, permettent de visualiser la répression de l'activité du promoteur de *fptA* (Figure 70).

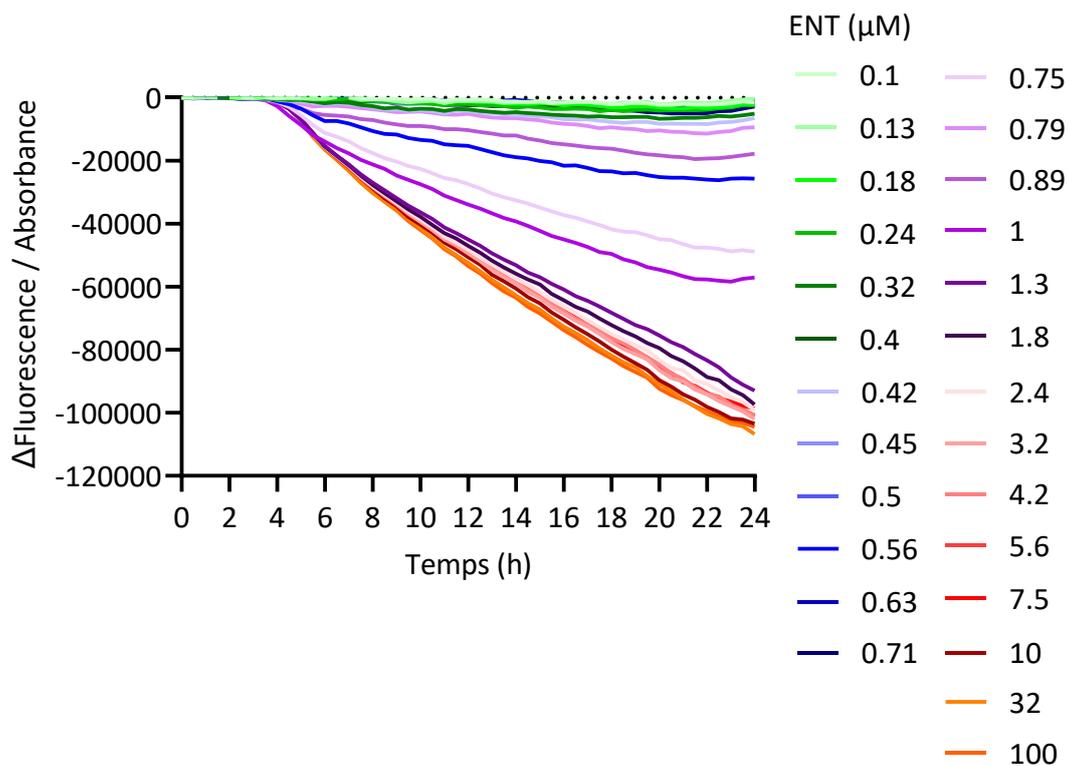
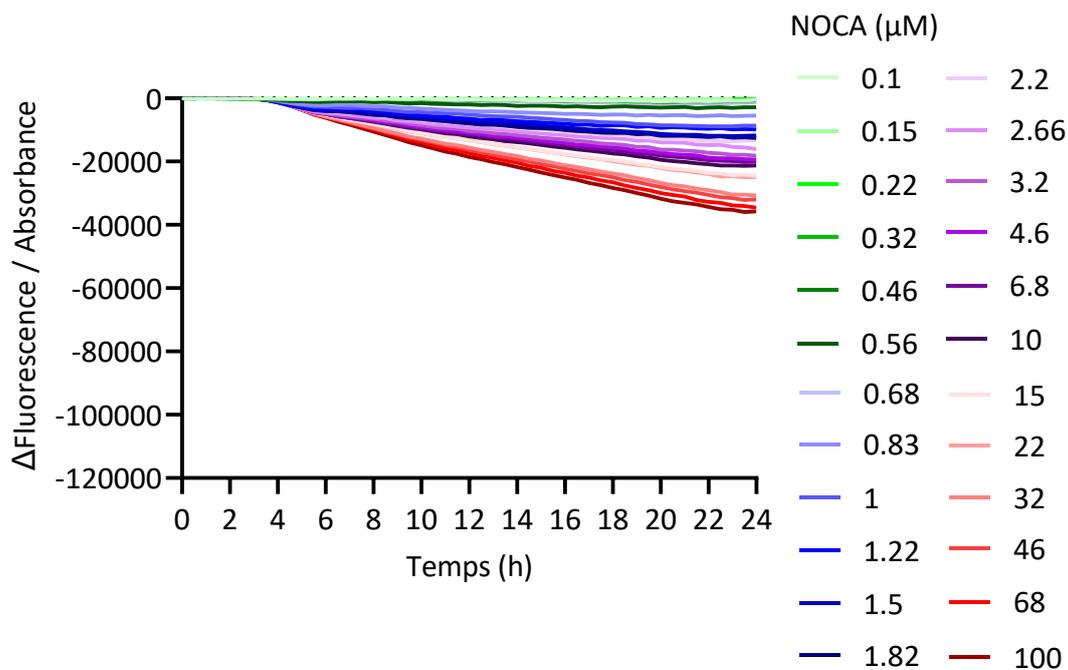
A**B**

Figure 69 : Fluorescence à 540 nm de la souche *promfptA*-YPet au cours de la croissance en présence des sidérophores ENT ou NOCA. La souche *promfptA*-YPet a été cultivée dans le milieu CAA en absence et en présence de concentrations allant de 0,1 à 100 μ M d'ENT (A) et de NOCA (B), et l'absorbance a été suivie à 600 nm ainsi que la fluorescence de YPet (excitation à 500 nm et émission à 540 nm). Pour chaque concentration est représenté le signal de fluorescence calculé avec l'équation (4). Trois

expériences indépendantes avec trois réplicats techniques ont été réalisées pour chaque concentration testée ($n=3$). Seules les moyennes des trois données sont présentées, les barres d'erreur ne sont pas affichées pour des raisons de lisibilité.

L'analyse des données présentées dans la Figure 70 révèle que la répression de l'expression de *fptA* en présence d'ENT se produit de manière binaire (switch On/Off), avec un changement d'expression autour de $1 \mu\text{M}$ d'ENT. Ce changement abrupt est modélisé par une équation de Hill avec un coefficient n élevé. Au-delà de $1 \mu\text{M}$ d'ENT, la répression de l'expression de *fptA* semble être totale. En revanche, la répression de l'expression de *fptA* par la NOCA est plus progressive et peut être représentée par une équation linéaire à coefficient directeur a négatif. Même avec une concentration de $100 \mu\text{M}$ de NOCA, la répression n'est pas totale, le gène continue d'être exprimé. Le schéma de répression de *fptA* semble être lié au schéma d'expression des gènes *pfeA* et *foxA*. En effet, l'ENT induit une expression de *pfeA* et une répression de *fptA* selon une courbe sigmoïdale, tandis que la NOCA induit une expression de *foxA* et une répression de *fptA* de manière linéaire en fonction de la concentration logarithmique. Afin d'étudier le lien entre la répression de *fptA* et l'activation de l'expression des gènes *pfeA* et *foxA* en présence de gradients de concentrations d'ENT et de NOCA respectivement, les jeux de données et les modèles correspondants ont été normalisés selon notre méthode de normalisation, afin de pouvoir être comparés aux modèles d'expression de *pfeA* et *foxA* définis dans le chapitre précédent (Figure 71). Les expressions de *pfeA* et *fptA* en présence d'ENT sont modélisées par des équations de Hill avec un coefficient n bien différent. L'expression de *fptA* est totalement réprimée à une concentration d'ENT supérieure à $1 \mu\text{M}$ et parallèlement, l'expression maximale de *pfeA* est atteinte pour une concentration d'ENT légèrement supérieure à $1 \mu\text{M}$. Les concentrations d'ENT nécessaires pour que l'expression génétique soit égale à la moitié de son maximum, K , sont du même ordre de grandeur. Malgré le fait que le schéma d'expression de *pfeA* est progressif alors que celui de *fptA* est de type On/Off, ils semblent être reliés. En effet, le passage de l'expression basale à l'expression maximale pour *pfeA* et celui de la surexpression à l'expression basale pour *fptA* ont lieu dans le même ordre de grandeur de concentrations d'ENT. Les expressions de *foxA* et *fptA* en présence de NOCA sont modélisées par des équations $L(x)$ avec un coefficient a positif pour *foxA* et négatif pour *fptA*, retranscrivant respectivement l'augmentation d'expression et la répression de ces deux gènes le long du gradient de concentration de NOCA. Les valeurs absolues des coefficients a de *foxA* et *fptA* et les valeurs de x_E sont dans le même ordre de grandeur. Les expressions de *foxA* et *fptA* sont modélisables par la même équation et les coefficients de chaque équation sont relativement proches. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les expressions de ces deux gènes semblent être, elles aussi, reliées dans une certaine mesure.

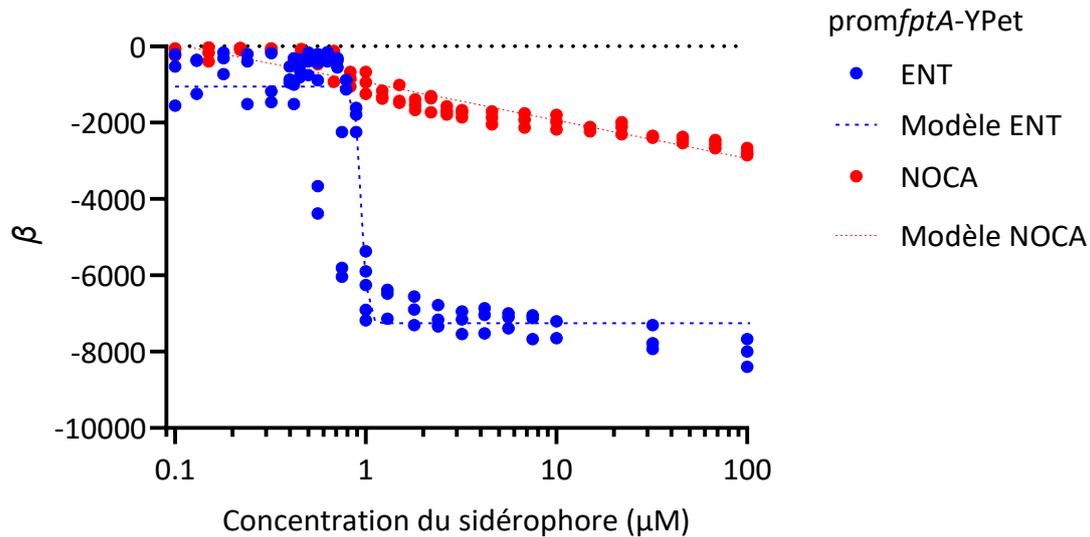


Figure 70 : Variation de la production de YPet pour la souche *promfpA-YPet* cultivée en milieu CAA en absence et en présence de concentrations croissantes d'ENT et de NOCA. Les valeurs β tracées en fonction de la concentration d'ENT sont représentées en bleu, et celles tracées en fonction de la concentration de NOCA sont représentées en rouge. La courbe sigmoïde ajustée avec l'équation de Hill (18) sur les données de *promfpA-YPet* en présence d'ENT est représentée par la ligne bleue en pointillés et les paramètres obtenus sont : $y_0 = -1050,26$, $y_{max} = -7253,55$, $n = 29,08$, $K = 0,95 \mu\text{M}$. La fonction linéaire $L(x)$ ajustée sur les données logarithmiques (19) de *promfpA-YPet* en présence de NOCA est représentée par la ligne pointillée rouge et les paramètres obtenus sont : $a = -996,97$ et $x_E = 0,110 \mu\text{M}$.

Les souches *promfpvA-YPet* et *promfpA-YPet* ont été validées et nous ont permis de suivre l'expression de *fpvA* et *fptA* en présence de gradients de concentrations d'ENT ou de NOCA. L'expression de *fpvA* et la production de PVDI ne sont pas affectées par la présence d'ENT ou de NOCA quelle que soit leur concentration. L'expression de *fptA* est réprimée par la présence d'ENT ou de NOCA selon un schéma ayant des similitudes avec celui de la surexpression de *pfeA* ou de *foxA* en présence d'un gradient de concentrations d'ENT ou de NOCA respectivement.

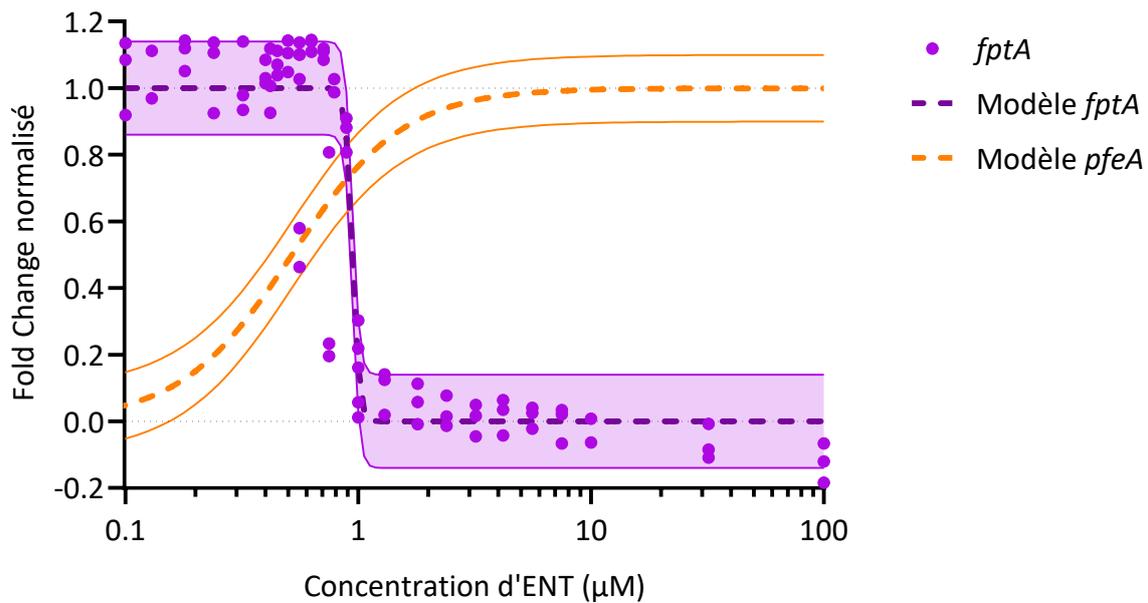
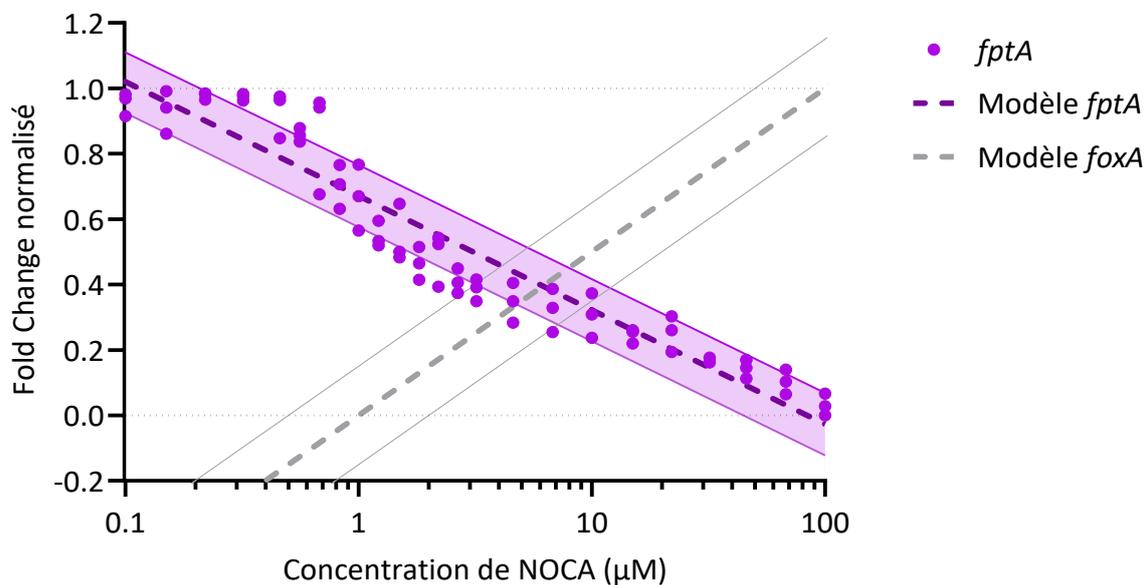
A**B**

Figure 71 : Normalisation de l'expression de *fptA*. Les données de fluorescence normalisées en Fold Change entre 0 et 1 pour la souche *promfptA*-YPet sont représentées en violet. (A) Les données produites en présence d'ENT ont été modélisées par une équation de Hill (18) de paramètres : $y_0 = 0$, $y_{max} = 1$, $n = 29,08$, $K = 0,95 \mu\text{M}$ avec une erreur de $\pm 12 \%$. La courbe de Hill du modèle d'expression de *pfeA* selon la concentration en ENT est représentée par des tirets orange avec une erreur de $\pm 10 \%$. Ses paramètres sont : $y_0 = 0$, $y_{max} = 1$, $n = 1,81$, $K = 0,52 \mu\text{M}$. (B) Les données produites en présence de NOCA ont été modélisées par une équation $L(x)$ de paramètres : $a = -0,35$ et $x_E = 0,11 \mu\text{M}$ avec une erreur de $\pm 9,5 \%$. La droite représentant le modèle d'expression de *foxA* selon la concentration

en NOCA est représentée par des tirets gris avec une erreur de $\pm 15\%$. Les paramètres de son équation $L(x)$ sont : $\alpha = 0,5$ et $x_E = 1 \mu\text{M}$.

4 Expression de PfeA, FoxA et FptA en présence de surnageant de cultures de bactéries produisant des sidérophores

Afin de vérifier si l'expression de *pfeA* et *foxA* était induite par des concentrations de sidérophores produites par les bactéries, nous avons étudié l'effet d'un surnageant de culture de bactéries produisant soit l'ENT ou la NOCA sur l'expression de ces deux TBDT à l'aide de nos souches rapportrices. Cette approche nous permet de nous rapprocher des conditions environnementales où chaque bactérie d'une même niche va sécréter ses sidérophores pour acquérir du fer. En cultivant *P. aeruginosa* en présence du surnageant d'une autre bactérie, non seulement la présence d'un exosidérophore, mais aussi le sécrétome de celle-ci peuvent potentiellement influencer le métabolisme et la physiologie de *P. aeruginosa*. En effet, les bactéries ont la capacité de produire et de libérer diverses molécules telles que des enzymes, des toxines, des facteurs de virulence et des protéines impliquées dans les interactions avec d'autres organismes (Muselius *et al.*, 2020; Zubair *et al.*, 2020). Pour vérifier si le sécrétome bactérien et plus particulièrement la quantité de sidérophores produits par les bactéries affectent la physiologie de *P. aeruginosa*, nous avons suivi la croissance de nos souches rapportrices en présence du surnageant d'autres bactéries, et mesuré la fluorescence émise par mCherry ou YPet (Figure 72A). Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*), une bactérie fréquemment associée aux infections pulmonaires et qui peut se retrouver en co-infection avec *P. aeruginosa* (Beaume *et al.*, 2015; Dowd *et al.*, 2008; Jones, 2010). Cette bactérie pathogène synthétise et sécrète de l'ENT pour acquérir du fer de son environnement (Podschun *et al.*, 1992). En contrôle, nous avons également testé le surnageant d'une souche de *Kp* ne produisant pas d'ENT. Pour cela, nous avons utilisé une souche de *Kp* pour laquelle le gène *entC*, codant pour une enzyme essentielle de la voie de biosynthèse de l'ENT, a été délété (Liu *et al.*, 1990). Cette souche est appelée *Kp* Δ entC. En comparant la fluorescence de *prompfeA*-mCherry cultivée avec le surnageant de *Kp* ou *Kp* Δ entC, nous pourrions déterminer si l'effet observé est spécifiquement attribuable à l'action de l'ENT (Figure 72B).

Nous avons également souhaité tester le surnageant de *Glutamicibacter arilaitensis* (*Ga*). Cette bactérie produit et sécrète de la NOCA pour acquérir du fer (Aron *et al.*, 2019; Cleary *et al.*, 2018). Nous avons donc voulu évaluer l'effet du surnageant de *Ga* sur nos souches afin de déterminer si la surexpression de *foxA* pouvait être observée. La voie de biosynthèse de la NOCA chez *Ga* n'étant pas connue, un mutant ne produisant pas de NOCA n'a pas pu être construit.

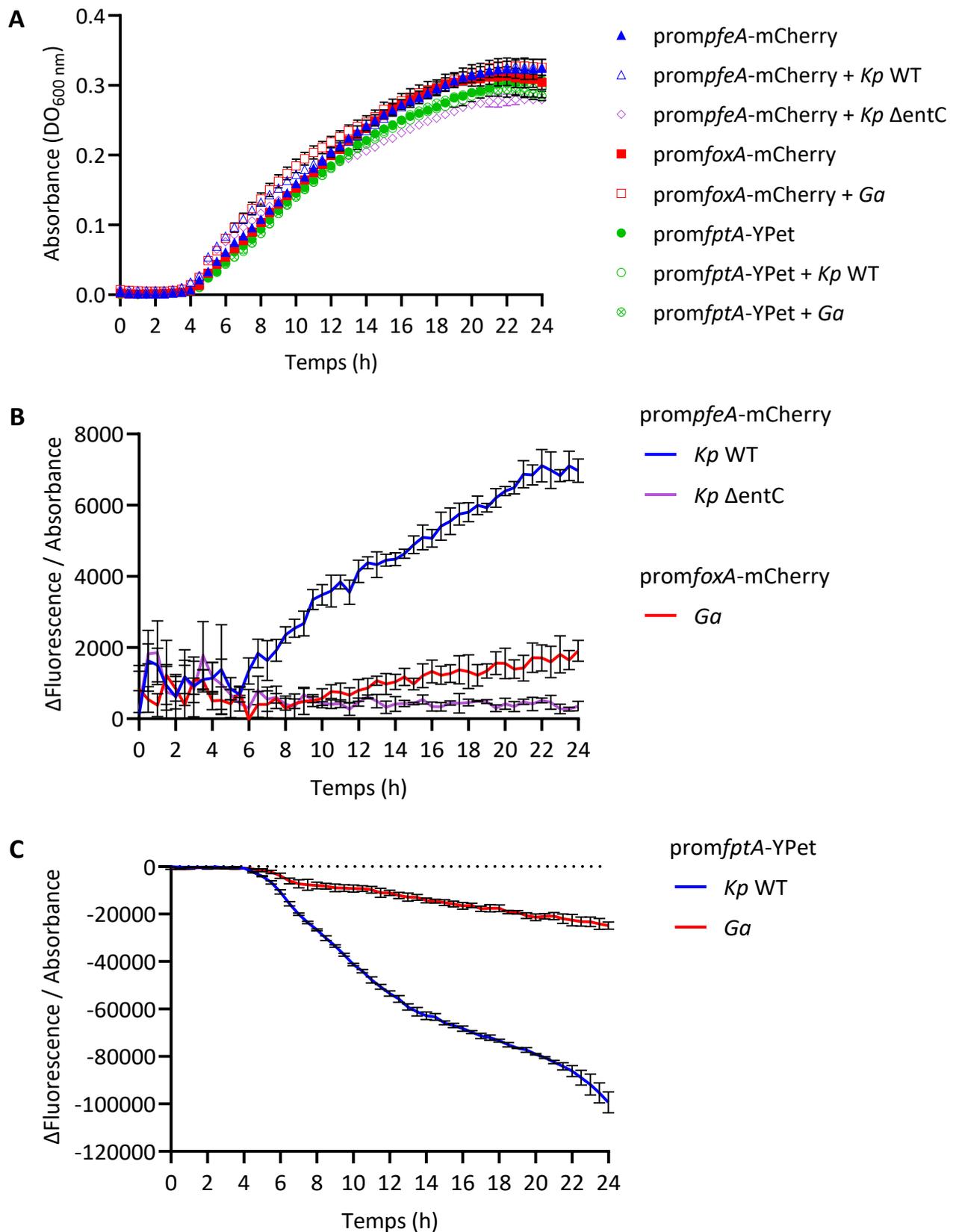


Figure 72 : Suivi de croissance et de fluorescence des souches *prompfeA*-mCherry, *promfoxA*-mCherry et *promfptA*-YPet en présence de surnageants de culture de *Kp* WT, *Kp* ΔentC ou *Ga*. *prompfeA*-mCherry, *promfoxA*-mCherry et *promfptA*-YPet ont été cultivées pendant 24 h dans un milieu composé à 50 % de CAA et 50 % de surnageant d'une culture de *Kp* WT, *Kp* ΔentC ou *Ga*. Comme témoin, chacune

des trois souches rapportrices a été cultivée dans un milieu CAA sans surnageant. Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque concentration testée (n=3). Les moyennes des trois données et les erreurs standards sont présentées. (A) La $DO_{600\text{ nm}}$ a été suivie pour étudier la croissance des souches *prompfeA*-mCherry, *promfoxA*-mCherry et *promfptA*-YPet avec ou sans surnageant de *Kp* WT, *Kp* Δ entC ou *Ga*. (B) Fluorescence de la souche *prompfeA*-mCherry en présence d'un surnageant de *Kp* WT ou *Kp* Δ entC par rapport à la condition témoin sans surnageant et de la souche *promfoxA*-mCherry en présence d'un surnageant de *Ga* par rapport à la condition témoin sans surnageant. (C) Fluorescence de la souche *promfptA*-YPet en présence d'un surnageant de *Kp* WT ou *Ga* par rapport à la condition témoin sans surnageant.

Les courbes de $DO_{600\text{ nm}}$ des souches *prompfeA*-mCherry, *promfoxA*-mCherry et *promfptA*-YPet cultivées en absence ou en présence de surnageant (Figure 72A) sont similaires, ce qui suggère que la présence du surnageant de culture de *Kp* WT, *Kp* Δ entC ou *Ga* n'affecte pas la croissance des souches rapportrices. Maintenant que nous avons établi que les surnageants de *Kp* ou *Ga* n'ont pas d'effet sur la croissance des souches de *P. aeruginosa*, nous avons cultivé les souches *prompfeA*-mCherry, *promfoxA*-mCherry et *promfptA*-YPet dans le surnageant de culture de *Kp* ou *Ga*, et l'absorbance à 600 nm et la fluorescence à 540 nm ont été suivies. Un surnageant provenant de la même culture a été utilisé pour toutes les cultures afin de mieux comparer les résultats. En contrôle, chaque souche rapportrice a été cultivée dans un milieu CAA sans surnageant. Les Figure 72B et C confirment que la souche *Kp* produit de l'ENT et que la souche *Ga* produit de la NOCA, car nous observons respectivement une activation du promoteur de *pfeA* parallèlement à une répression de *fptA* et nous observons une activation du promoteur de *foxA* parallèlement à une répression de *fptA*. Chaque courbe de fluorescence a été analysée, modélisée et nous avons calculé les valeurs de β . Ces valeurs de β ont été comparées aux différents modèles établis pour chaque souche en fonction du gradient de concentrations d'ENT ou de NOCA.

En reprenant les données β de la souche *prompfeA*-mCherry et l'équation de Hill avec les paramètres associés, la RMSE entre les données et le modèle est égale à 60,608. La valeur β moyenne de la souche *prompfeA*-mCherry cultivée dans le surnageant de *Kp* est égale à 650,820 (Figure 73A). Pour retrouver la concentration d'ENT dans le surnageant, nous allons utiliser cette valeur β plus ou moins la valeur de la RMSE, soit $650,820 \pm 60,608$. En intégrant ces valeurs dans l'équation de Hill, nous trouvons une concentration d'ENT de $0,952 \pm 0,209$ μM . De la même manière, en reprenant les données β de la souche *promfptA*-YPet et l'équation de Hill avec les paramètres associés, nous avons calculé une RMSE égale à 878,630. La valeur β moyenne de la souche *promfptA*-YPet cultivée dans le surnageant de *Kp* est égale à -3352,691 (Figure 73B). En intégrant $-3352,691 \pm 878,630$ dans l'équation de Hill avec les paramètres associés, nous trouvons une concentration d'ENT de $0,929 \pm 0,022$ μM . Une concentration similaire d'ENT a été trouvée avec nos deux souches *prompfeA*-mCherry et *promfptA*-YPet, ce qui

valide ces résultats, et, par la même occasion, permet une validation croisée de nos constructions et de nos modèles mathématiques.

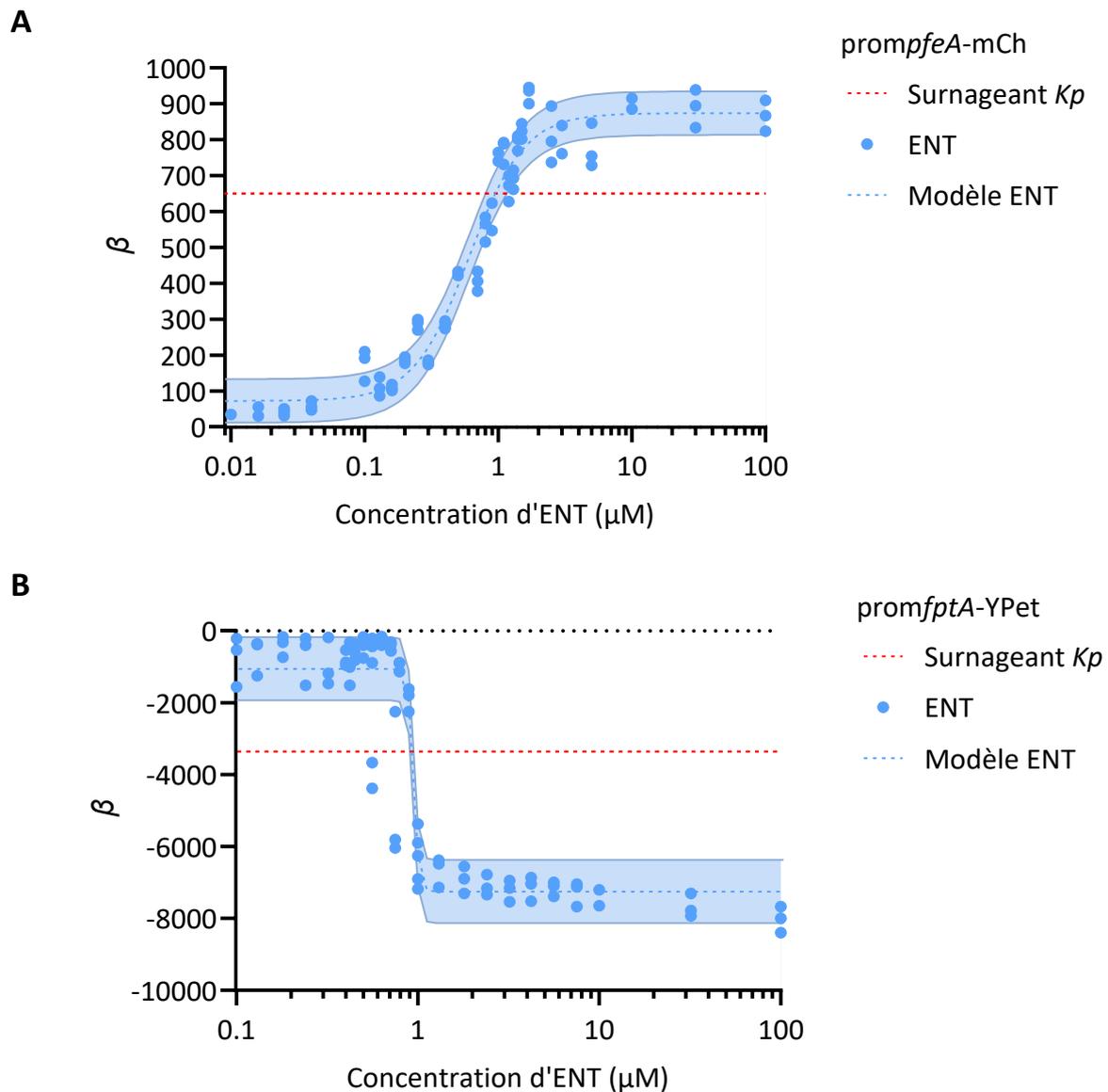


Figure 73 : Production de mCherry par la souche *prompfeA-mCherry* et de YPet par la souche *promfpptA-YPet* dans des cultures avec du surnageant de *Kp*. *Kp* a été cultivé pendant 24 h dans un milieu CAA et le surnageant a été récupéré en fin de culture. Les souches *prompfeA-mCherry* (A) et *promfpptA-YPet* (B) ont été cultivées pendant 24 h dans un milieu comprenant 50 % de surnageant de culture de *Kp* et 50 % de milieu CAA. Ces expériences ont été menées avec des triplicats biologiques. Les mêmes surnageants de culture de *Kp* ont été utilisés entre les expériences avec *prompfeA-mCherry* et *promfpptA-YPet* et pour les trois réplicats biologiques à chaque fois. La fluorescence différentielle pour chaque condition a été calculée et analysée, les valeurs β ont été trouvées comme décrit précédemment. Pour chaque souche, la moyenne des β des conditions avec surnageant de *Kp* est présentée (n=3) comparativement aux données et modèles avec l'ENT.

En utilisant le même raisonnement avec la souche *promfoxA-mCherry* et l'équation $L(x)$ avec les paramètres associés, nous pouvons faire une estimation de la concentration de NOCA dans le surnageant de *Ga*. En reprenant les données β et l'équation avec les paramètres associés, la RMSE entre les données et le modèle est égale à 33,700. La valeur β moyenne de la souche *promfoxA-mCherry* cultivée dans le surnageant de *Ga* est égale à 141,621 (Figure 74A). Pour retrouver la concentration de NOCA dans le surnageant, nous allons utiliser cette valeur β plus ou moins la valeur de la RMSE, soit $141,621 \pm 33,700$. En intégrant ces valeurs dans l'équation $L(x)$, nous trouvons une concentration de NOCA de $2,439 \pm 1,027 \mu\text{M}$. De la même manière, en reprenant les données β de la souche *promfptA-YPet* et l'équation $L(x)$ avec les paramètres associés, nous avons calculé une RMSE égale à 271,660. La valeur β moyenne de la souche *promfptA-YPet* cultivée dans le surnageant de *Ga* est égale à -1930,500 (Figure 74B). En intégrant $-1930,500 \pm 271,660$ dans l'équation $L(x)$ avec les paramètres associés, nous trouvons une concentration de NOCA de $9,760 \pm 6,828 \mu\text{M}$. Les concentrations de NOCA trouvées avec les modèles de *promfoxA-mCherry* et *promfptA-YPet* ne sont pas significativement différentes et elles restent dans le même ordre de grandeur. Nous pouvons donc, ici aussi, valider ces résultats et valider nos constructions et nos modèles mathématiques.

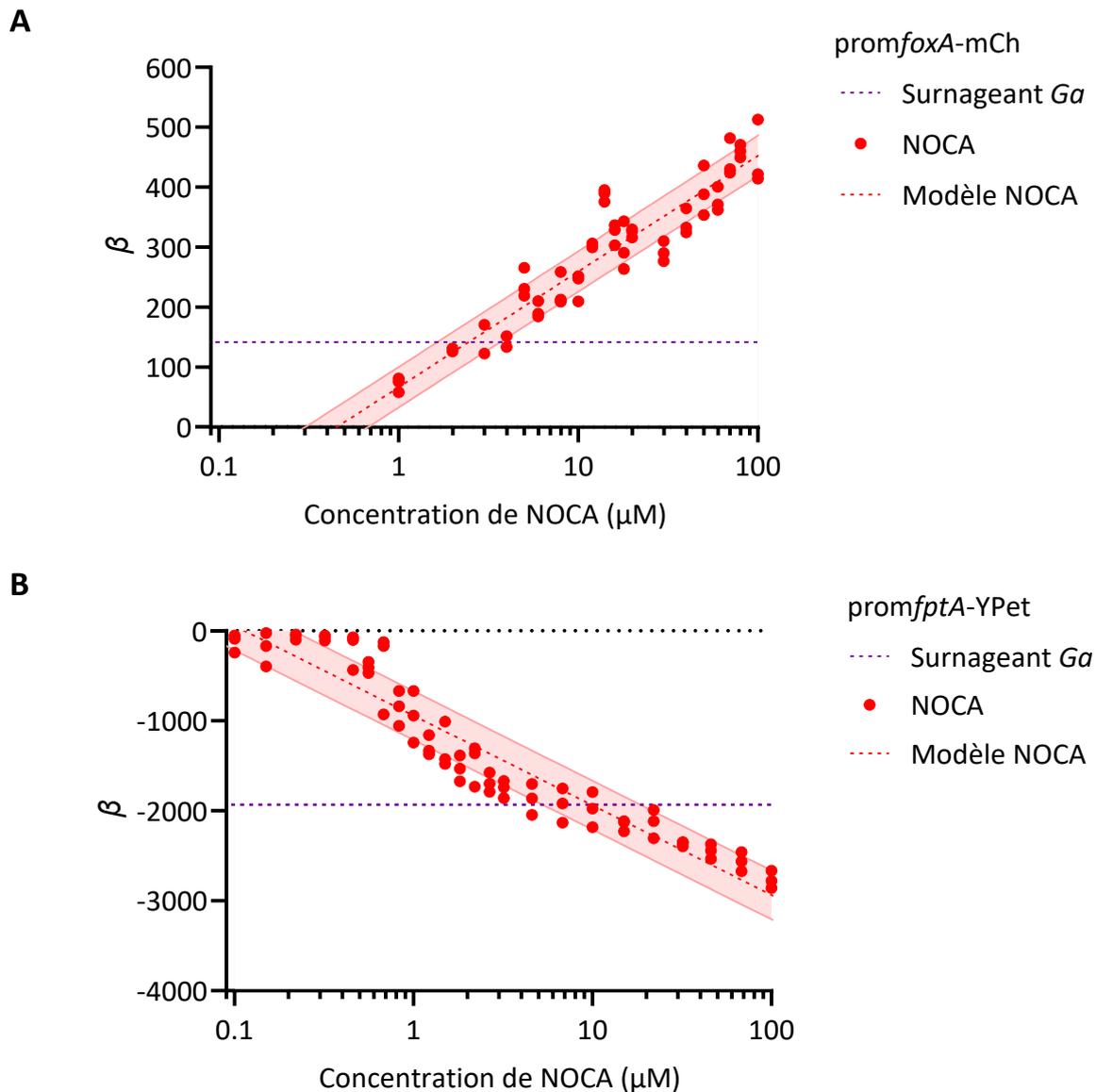


Figure 74 : Production de mCherry par la souche *promfoxA-mCherry* et de YPet par la souche *promfptA-YPet* dans des cultures avec du surnageant de *Ga*. *Ga* a été cultivé pendant 24 heures dans un milieu CAA et le surnageant a été récupéré en fin de culture. Les souches *promfoxA-mCherry* (A) et *promfptA-YPet* (B) ont été cultivées pendant 24 heures dans un milieu comprenant 50 % de surnageant de culture de *Ga* et 50 % de milieu CAA. Ces expériences ont été menées avec des triplicats biologiques. Les mêmes surnageants de culture de *Ga* ont été utilisés entre les expériences avec *promfoxA-mCherry* et *promfptA-YPet* et pour les trois réplicats biologiques à chaque fois. La fluorescence différentielle pour chaque condition a été calculée et analysée, les valeurs β ont été trouvées comme décrit précédemment. Pour chaque souche, la moyenne des β des conditions avec surnageant de *Ga* est présentée (n=3) comparativement aux données et modèles avec la NOCA.

En conclusion, les souches *prompfeA-mCherry*, *promfoxA-mCherry* et *promfptA-YPet* ont été cultivées en présence de surnageants de cultures de *Kp* et *Ga*, des bactéries compétitrices pour le fer produisant leurs propres sidérophores. Nos souches rapportrices ont permis de déterminer la concentration physiologique d'ENT ou de NOCA dans les surnageants de culture des bactéries productrices. Ces

souches ont montré leur intérêt à être utilisées comme outil pour étudier l'homéostasie du fer de systèmes complexes comme le microbiote par exemple.

PARTIE IV :

DISCUSSION & CONCLUSION

La capacité de *P. aeruginosa* à utiliser diverses stratégies et différents exosidérophores pour accéder au fer, avec des mécanismes moléculaires distincts, confère un avantage significatif dans la colonisation de communautés polymicrobiennes complexes présentes dans une variété d'environnements. Une bactérie capable d'utiliser les sidérophores d'un concurrent dans une stratégie de piratage aura un avantage significatif dans la lutte pour la survie ou la domination d'une niche écologique. Un exemple concret est le système respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, où *P. aeruginosa* peut coexister avec des bactéries telles que *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xyloxidans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium abscessus*, *Haemophilus influenzae* et des pneumocoques. De plus, *P. aeruginosa* peut également être en contact avec des pathogènes fongiques tels que *Aspergillus sp.* ou *Scedosporium sp.* (Bellis *et al.*, 2019). Tous ces micro-organismes sont en compétition pour le fer, cependant, la manière dont *P. aeruginosa* parvient à utiliser efficacement ces multiples exosidérophores dans un environnement aussi complexe demeure encore peu comprise.

1 Construction génétique de gène rapporteur par fusion de promoteur

Les méthodes précédemment utilisées dans la littérature pour comprendre les mécanismes d'acquisition des exosidérophores complexés au fer chez *P. aeruginosa* impliquent principalement des techniques telles que l'approche globale de protéomique, l'analyse transcriptionnelle ciblée par qRT-PCR, des études de biologie moléculaire et de biochimie pour identifier les fonctions des différentes protéines impliqués dans ces voies, et des approches structurales pour visualiser la structure des protéines impliqués dans ces voies d'import du fer (Gasser *et al.*, 2016; Moynié *et al.*, 2019; Normant *et al.*, 2020, 2022; Perraud *et al.*, 2020b, 2020a). Ces approches ont permis d'identifier les TBDT impliqués dans l'import du fer par des sidérophores, des exosidérophores ou des sidéromycines, et ont mis en évidence l'adaptation phénotypique complexe de *P. aeruginosa* en réponse à la présence de chélateurs de fer exogènes dans son environnement.

Pour étudier plus précisément l'expression des différentes voies d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa*, il nous est apparu essentiel de développer de nouveaux outils capables de générer rapidement et à faible coût un grand volume de données, permettant ainsi d'explorer un large éventail de conditions expérimentales.

Afin d'étudier l'expression génétique des gènes codants pour les TBDT, nous avons choisi d'utiliser la stratégie du gène rapporteur par fusion de promoteur. Dans cette stratégie, la séquence du promoteur

du gène d'intérêt est fusionnée à la séquence codante d'une protéine rapportrice qui peut être facilement quantifiée (Casadaban, 1976). Les premières souches utilisées dans l'étude de l'expression génétique de *pfeA* et *foxA* ont été construites avec mCherry comme rapporteur car sa stabilité et son efficacité pour ce type de stratégie ont déjà été prouvées à de nombreuses reprises (Garay-Novillo *et al.*, 2019; García-Cayuela *et al.*, 2012; Mohedano *et al.*, 2015). De plus, ses domaines d'excitation et d'émission de fluorescence (longueurs d'ondes d'excitation : 570 nm et d'émission : 610 nm) ne chevauchent pas ceux de la PVDI (longueurs d'ondes d'excitation : 400 nm et d'émission : 447 nm), produite par nos souches. Nous avons pu voir dans notre étude que le rendement de fluorescence de mCherry pouvait être une limite. En effet, à des concentrations de NOCA inférieures à 1 μ M, aucune fluorescence différentielle par rapport à la condition de culture sans sidérophore n'est détectée pour la souche *promfoxA*-mCherry (Partie Résultats, Chapitre 2, Figure 5). Comme nous ne pouvons pas dépasser une concentration de 100 μ M dans nos expériences à cause de la précipitation du sidérophore, le domaine d'analyse de notre système est restreint à deux ordres de grandeur. Pour contourner ce problème dans nos expériences futures, nous avons décidé d'utiliser un autre rapporteur avec un meilleur rendement de fluorescence. Nous avons choisi d'utiliser YPet car cette protéine a un excellent rendement de fluorescence, elle a déjà été validée comme molécule rapportrice (Yoon *et al.*, 2013) et ses domaines d'excitation et d'émission de fluorescence (longueurs d'ondes d'excitation et émission : 500 nm et 540 nm) ne chevauchent pas ceux de la PVDI. L'intensité de fluorescence détectée dans nos expériences avec les souches *promfpvA*-YPet et *promfptA*-YPet est beaucoup plus importante, ce qui permet aux variations des données d'être plus discriminantes. Utiliser YPet plutôt que mCherry dans notre stratégie semble pouvoir repousser les limitations techniques observées.

2 Expression génétique de *pfeA* et *foxA* en présence de concentrations croissantes d'un exosidérophore

Les résultats obtenus avec les souches *prompfeA*-mCherry et *promfoxA*-mCherry ont permis de montrer que l'expression des gènes *pfeA* et *foxA* ne répondait pas de la même manière et avec la même efficacité à la présence de concentrations croissantes de leurs sidérophores correspondants. La transcription de *pfeA* présente une forme sigmoïdale, tandis que la transcription de *foxA* est linéaire dans un domaine logarithmique. Pour *pfeA*, le maximum de transcription a été atteint avec 3 μ M d'ENT, tandis que dans le cas de *foxA*, le maximum n'a pas été atteint avec 100 μ M de NOCA. Il est probable que le schéma d'expression de *foxA* suive une forme sigmoïdale, comme c'est souvent le cas lors d'une réponse transcriptionnelle (Bottani and Veitia, 2017; Santillán, 2008). Dans notre système

actuel, nous pourrions uniquement observer la phase linéaire de la sigmoïde. À ce stade, nous n'avons pas pu identifier les mécanismes de régulation qui entraînent une telle différence dans le profil d'expression. Est-ce comme discuté dans l'article présenté dans le chapitre 2 de la partie Résultats, la différence dans le type de régulateur impliqué : système à deux composantes pour *pfeA* et facteur σ et anti- σ pour *foxA*. Il serait intéressant de réaliser une étude similaire sur deux autres gènes codant pour des TBDT, l'un ayant sa transcription régulée par un facteur σ comme par exemple *fiuA* (voie du FERRI-Fe), *fecA* (voie du citrate-ferrique) ou encore *fpvA* (voie de la PVDI-Fe), et le second par un système à deux composantes comme *pirA* (voie des monocatéchols ferrique). Pour *fpvA*, il serait intéressant de construire une souche rapportrice fluorescente ne produisant pas de PVDI et la cultiver en présence de concentrations croissantes de PVDI.

Une autre question importante générée par ces premiers résultats a été de savoir si *pfeA* et *foxA* vont avoir le même type de profil d'expression peu importe le sidérophore qu'ils vont transporter. Pour répondre à cette question, nous avons cherché à visualiser le schéma d'expression de *pfeA* en présence d'un gradient de concentrations d'un autre sidérophore de type catéchol, la PROTO. La PROTO est connue pour être transportée par PfeA et activer son expression (Gasser *et al.*, 2016). La modélisation des données de fluorescence obtenues avec *prompfeA*-mCherry en présence de PROTO révèle un schéma d'expression de *pfeA* en fonction de la concentration de cet exosidérophore de type sigmoïdal. Les paramètres de l'équation de Hill, utilisée pour modéliser les données de PROTO, montrent des différences dans l'expression de *pfeA* par rapport à l'ENT. Les valeurs de n , qui représentent la transition de l'état non exprimé à la surexpression, sont similaires pour les deux sidérophores. En revanche, les concentrations nécessaires pour déclencher la surexpression diffèrent ($K = 0,606 \mu\text{M}$ avec l'ENT et $K = 0,007 \mu\text{M}$ avec la PROTO), tout comme les niveaux maximaux d'expression des deux gènes ($y_{max} = 874,074$ avec l'ENT et $y_{max} = 412,598$ avec la PROTO). Bien que PfeA lie le complexe PROTO-Fe de la même manière que le complexe ENT-Fe (Moynié *et al.*, 2019), le fer est transporté clairement moins efficacement qu'avec l'ENT : 1306 ± 220 atomes de ^{55}Fe /bactérie/min pour l'ENT et seulement 273 ± 62 pour la PROTO (Gasser *et al.* 2016). Par ailleurs, le complexe PROTO-Fe n'est certainement pas hydrolysée par PfeE comme le complexe ENT-Fe dans le périplasme de la bactérie (Perraud *et al.*, 2018), car il ne possède pas de fonctions esters mais des fonctions amides. Ceci implique que le fer ne se dissocie probablement pas de la PROTO dans le périplasme de la bactérie et que les complexes PROTO-Fe s'y accumulent et interagissent certainement plus efficacement avec le senseur PfeS d'où une induction de l'expression de *pfeA* à des concentrations plus faible qu'avec l'ENT. Il serait intéressant de déléter le gène *pfeE* dans la souche rapportrice *prompfeA*-mCherry et de voir l'effet sur l'expression de *pfeA* en présence d'un gradient de concentrations d'ENT.

Nous avons cultivé la souche *promfoxA-mCherry* en présence d'un gradient de concentrations de DFOB afin d'évaluer son impact sur l'expression de *foxA*. L'analyse des données montre que l'expression de *foxA* peut être modélisée par une équation linéaire en fonction de la concentration logarithmique de DFOB, tout comme avec la NOCA. Malgré la similarité structurelle entre la NOCA et la DFOB, nous avons observé des différences dans le schéma d'expression en présence de ces deux sidérophores. L'augmentation de l'expression de *foxA* est plus progressive et commence à des concentrations plus faibles avec la DFOB par rapport à la NOCA, mais les niveaux d'expression convergent à des concentrations élevées. La liaison de NOCA-Fe et DFOB-Fe à FoxA est similaire (Normant *et al.*, 2020), ce qui suggère une interaction comparable entre FoxA et le facteur anti- σ FoxR dans le périplasme de la bactérie, induisant ainsi une cascade de réactions conduisant à une induction de l'expression de *foxA*. Cependant, il convient de noter que FoxA présente une affinité légèrement supérieure pour DFOB-Fe par rapport à NOCA-Fe (Normant *et al.*, 2020), ce qui peut entraîner des dynamiques de régulation et de transport différentes entre les complexes ferriques. Alors que NOCA-Fe est exclusivement transporté par FoxA, DFOB-Fe peut également être transporté par FpvB (Chan and Burrows, 2022; Normant *et al.*, 2020). Il n'y a pas d'induction de l'expression de *fpvB* en présence de DFOB-Fe (Normant *et al.*, 2020), et aucun système de régulation positif n'a été identifié pour ce gène. Le rôle de FpvB dans le transport de DFOB-Fe pourrait être secondaire, car nos résultats montrent que le niveau d'expression de *foxA* en présence de DFOB-Fe est similaire voire supérieur à celui en présence de NOCA-Fe. Les mécanismes sous-jacents à cette différence de régulation observée nécessitent une étude plus approfondie pour être pleinement compris.

3 Expression génétique de *fpvA* et *fptA* en présence de concentrations croissantes d'ENT ou de NOCA

Les résultats de l'étude avec la souche rapportrice *promfpvA-YPet* ont montré que l'expression génétique de *fpvA* n'était pas impactée par la présence d'un gradient de concentrations d'ENT ou de NOCA, contrairement à l'expression de *fptA*. Les voies d'acquisition des sidérophores endogènes sont régulées par des mécanismes d'auto-activation, ce qui signifie qu'une concentration plus faible de PVDI-Fe et PCH-Fe dans le milieu entraînera une réduction de leur expression. Il est alors compréhensible que l'expression de *fpvA* ne soit pas modifiée en présence de NOCA car les affinités pour le fer de la PVDI et de la NOCA sont proches ($K_a = 10^{30,8} \text{ M}^{-1}$ pour la PVDI (Albrecht-Gary *et al.*, 1994) et $K_a = 10^{32} \text{ M}^{-1}$ pour la NOCA (Anderegg *et al.*, 1963)). En revanche, il reste à éclaircir le fait que la présence d'ENT ($K_a = 10^{49} \text{ M}^{-1}$ (Loomis and Raymond, 1991)) dans le milieu n'affecte pas l'expression

de *fptA*. Malgré la présence d'ENT à de fortes concentration, la PVDI semble toujours être capable de chélater le fer et l'importer dans *P. aeruginosa*.

En présence d'exosidérophores, *P. aeruginosa* est capable de réprimer les voies de biosynthèse et d'acquisition de la PCH dans le but d'économiser ses ressources, tout en préservant sa voie principale d'acquisition du fer, la voie de la PVDI. Dans nos expériences, les exosidérophores sont ajoutés au début de la culture, lorsque les bactéries se trouvent dans un milieu CAA frais. Ainsi, aucune PVDI n'est présente dans le milieu au moment de l'ajout des exosidérophores. La compétition pour le fer entre ces différents chélateurs est à l'avantage des exosidérophores qui se trouvent en forte concentration dans le milieu comparativement à la PVDI. Cependant, les voies de la PVDI restent actives et la production de PVDI reste constante, que les bactéries soient en présence ou non d'exosidérophores (Figure 67). Les raisons de ce phénomène pourraient être que la surexpression de la voie d'acquisition de la PVDI n'est pas entièrement dépendante de l'absorption des complexes PVDI-Fe, ou que la PVDI est capable de chélater le fer même en présence d'une concentration élevée d'ENT, malgré la grande différence d'affinité entre ces deux sidérophores. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes qui permettent le maintien de la production de la PVDI et l'expression génétique de sa voie d'acquisition en présence d'exosidérophores.

Les résultats obtenus avec la culture de la souche *promfptA*-YPet en présence d'exosidérophores ont révélé plusieurs observations intéressantes. Premièrement, la répression totale de *fptA* et l'expression maximale de *pfeA* sont atteintes à des concentrations d'ENT similaires. Deuxièmement, la répression de *fptA* et l'expression de *foxA* sont progressivement observées de manière parallèle avec des concentrations croissantes de NOCA. Ces observations peuvent être expliquées par plusieurs facteurs. La PCH présente une affinité plus faible pour le fer par rapport à l'ENT et à la NOCA, peu de complexe PCH-Fe se forment, ce qui entraîne une répression de la voie d'acquisition de la PCH-Fe car le régulateur transcriptionnel PchR n'est plus actif. De plus, ces résultats pourraient suggérer une corrélation entre la régulation de la voie d'acquisition de la PCH-Fe et celles des voies d'acquisition des exosidérophores. Cette corrélation mettrait en évidence une forte interconnexion entre les systèmes de régulation des voies d'acquisition du fer exogènes et endogènes. Mis à part Fur, aucun autre système de régulation n'a été identifié pour relier l'expression de *fptA* à celle de *pfeA* ou de *foxA*. Une étude récente a mis en évidence l'existence d'un système de régulation entre la voie de biosynthèse de la PCH et l'acquisition d'hème (Hoang *et al.*, 2023). Dans cette étude, il a été démontré que PchE, un NRPS de la voie de biosynthèse de la PCH, est réprimé par le sRNA PrrH. La transcription de PrrH est activée par PhuS, un régulateur associé à l'une des voies d'acquisition d'hème. Bien que la répression des voies de biosynthèse et d'acquisition de la PCH en présence d'exosidérophores soit documentée, les mécanismes moléculaires de cette répression demeurent incertains. Cependant, sur

la base de ces derniers résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que PrrH ou un système similaire est impliqué dans ce phénomène.

Les résultats de notre étude renforcent l'efficacité des vecteurs synthétiques d'antibiotiques basés sur la structure de siderophores de type catéchol plutôt que de type hydroxamate. En effet, nous avons observé que la surexpression de PfeA atteint son maximum à une concentration plus faible de complexe exosidérophore-Fe que celle de FoxA. De plus, la répression totale de la voie de la PCH indique que la bactérie peut optimiser l'acquisition de ce type de complexe lorsqu'il est présent dans son environnement au-delà d'une certaine concentration. Ces caractéristiques font des siderophores de type catéchol des molécules bien adaptées pour la stratégie du Cheval de Troie dans la vectorisation d'antibiotiques.

4 Quantifications de sidérophore dans des surnageants de culture

L'utilisation de surnageants de culture bactérienne pour étudier les interactions entre les sidérophores est une approche pertinente pour simuler les conditions environnementales dans lesquelles chaque bactérie d'une même niche sécrète ses sidérophores pour acquérir du fer. Malgré le fait que nos souches de *P. aeruginosa* aient été cultivées dans un milieu contenant diverses molécules sécrétées par d'autres micro-organismes, telles que des toxines ou des facteurs de virulence, les bactéries ont pu se développer correctement et la fluorescence des marqueurs mCherry ou YPet a pu être analysée. Cela renforce la possibilité d'utiliser ces souches dans d'autres systèmes, même dans des conditions de culture moins optimales. Une prochaine étape consisterait à utiliser ces souches dans des systèmes de biofilm, de co-culture avec d'autres micro-organismes et dans des systèmes d'infection.

L'utilisation de surnageants de culture a également révélé une autre utilité des souches rapportrices : la détection et la quantification de sidérophores dans un milieu complexe. Cette approche pourrait présenter un potentiel biotechnologique novateur. Ces souches pourraient être des outils permettant d'identifier si une bactérie produit ou non un sidérophore donné et à quelle concentration il est sécrété dans le milieu de culture.

5 Modèles d'apprentissage pour la modélisation de l'expression de TBDT en présence de mélange de sidérophores

5.1 Problématique

Les résultats des expériences avec les mélanges d'ENT et de NOCA ont révélé que l'expression des gènes *pfeA* et *foxA* réagit différemment en fonction des concentrations respectives d'ENT et de NOCA. Dans le cas de *pfeA*, la présence de NOCA n'a aucun impact sur son expression, tandis que la souche *promfoxA-mCherry* montre une diminution d'émission de fluorescence de mCherry, et donc d'expression de *foxA* avec l'augmentation de la concentration d'ENT. Cette observation est probablement due à la différence d'affinité pour le fer entre l'ENT et la NOCA. Cependant, malgré cette disparité d'affinité, la NOCA est capable de chélater le fer même en présence d'une concentration importante d'ENT, ce qui se traduit par une activation de la production de mCherry dans *promfoxA-mCherry*. Lorsqu'il y a une compétition pour le fer entre plusieurs sidérophores, les affinités et les concentrations de chaque molécule ont un rôle important dans l'issue de cette compétition, néanmoins, il est clair que d'autres facteurs peuvent également influencer la chélation du fer comme le pH. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents.

Pour caractériser le phénomène observé, nous avons cherché à trouver un modèle analytique, c'est-à-dire pour lequel nous pouvons écrire l'équation mathématique en utilisant des paramètres facilement dérivés à partir des mesures (Figure 62). Ce modèle devait répondre à notre problématique, il devait pouvoir prendre en entrée la concentration en ENT et en NOCA (ENT , $NOCA$) et donner en sortie les niveaux d'expression de PfeA et FoxA (Figure 55). Nous avons pu constater que la complexité du modèle mathématique augmente de manière exponentielle avec le nombre de paramètres d'entrée à prendre en compte. Dans notre domaine d'étude, il n'a pas été possible de trouver une équation pertinente pour caractériser les effets observés des mélanges d'ENT et NOCA sur l'expression de FoxA. Un modèle de ce type n'est pas approprié dans le cas présent, il le sera encore moins pour la suite du projet où nous chercherons à complexifier le système.

Une alternative aux modèles mathématiques analytiques est d'utiliser des fonctions d'interpolation multidimensionnelle linéaire (IML) ou cubique (IMC) (Lions and Peetre, 1964). C'est ce type d'interpolation qui ont notamment permis de générer les cartes représentées sur la Figure 61. Bien que très pratique pour la représentation des données, ces interpolations disposent d'un pouvoir de prédiction assez faible et ont également une complexité qui croît exponentiellement avec le nombre de variable. Les IML ne permettent en général pas de représenter efficacement des comportements fortement non-linéaire comme ceux que l'on rencontre en biologie (comportement de forme

sigmoïdale par exemple). Les IMC sont à l'inverse beaucoup plus efficace dans ce domaine, mais en contrepartie elles ont tendance à créer des artefacts, en particulier lorsque l'on travaille avec des données bruitées ou parcellaires. C'est par exemple le comportement qui peut être observé sur la Figure 61B le long de la ligne horizontale correspondant à $NOCA = 70 \mu M$.

Une troisième alternative que nous avons évaluée est le recours à des méthodes d'apprentissage supervisé (*Supervised Learning*, SL). Nous en avons testé trois types, à savoir la méthode des plus proches voisins (*K Nearest Neighbors*, KNN) (Cover and Hart, 1967), les arbres de décisions (Breiman, 2001) et les réseaux de neurones (*Neural Network*, NN) (Hopfield, 1982). Pour l'ensemble de ces algorithmes, le modèle mathématique est établi automatiquement en se basant sur un certain nombre de mesures de référence que l'on appelle aussi base de données d'entraînement (*Learning Data Set*, LDS).

5.2 Régression par plus proches voisins (KNN)

Pour prédire la réponse du système à une entrée quelconque $(ENT, NOCA)$, l'algorithme KNN commence par identifier dans le LDS les k mesures $(ENT_k, NOCA_k)$ ayant la distance avec le point considéré la plus faible. Ici, la distance est la distance euclidienne calculée ainsi : $d_k = \sqrt{(ENT - ENT_k)^2 + (NOCA - NOCA_k)^2}$. La prédiction sera ensuite une moyenne pondérée par la distance des mesures que l'on a effectuée en ces k voisins (Figure 75). k est un méta-paramètre de l'algorithme qu'il convient de choisir. Une valeur faible k conduit à de grandes zones dans lesquels la prédiction sera constante, en particulier aux endroits où le LDS est le plus parcellaire. À l'inverse, une forte valeur k conduit à la prise en compte dans le calcul de la prédiction de points correspondant à des conditions expérimentales très éloignées, et donc non pertinentes. Les avantages de cet algorithme sont les suivants : il est facile à implémenter en raison de sa simplicité et de sa précision, il s'ajuste automatiquement lorsque de nouveaux échantillons d'apprentissage sont ajoutés, et il ne nécessite que la spécification d'une valeur k et d'une mesure de distance, ce qui le rend moins complexe que d'autres algorithmes d'apprentissage automatique.

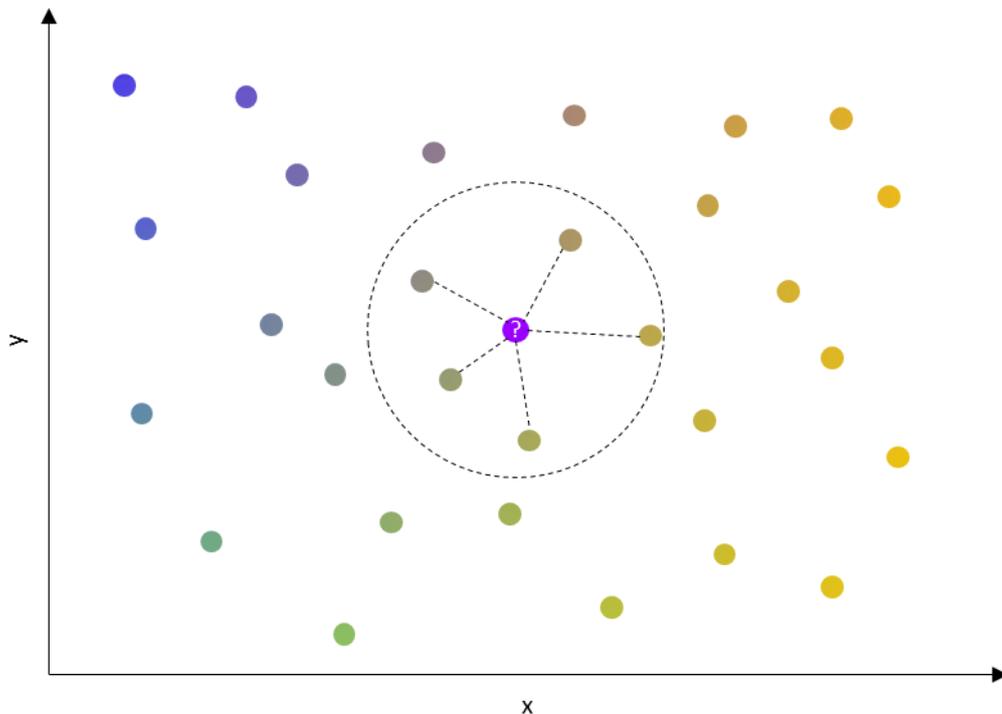


Figure 75 : Exemple de la méthode KNN avec $k = 5$. Chaque point possède sa propre valeur. Les distances euclidiennes entre l'échantillon violet et ses 5 plus proches voisins et les valeurs associées à ces points vont pouvoir déterminer la valeur de l'échantillon.

5.3 Arbres de décision

Les arbres de décisions ressemblent quant à eux à des organigrammes où la direction prise à chaque nœud correspond à la comparaison d'une entrée à un seuil calculé automatiquement lors de l'apprentissage pour être le plus discriminant. Souvent, un seul arbre n'est pas suffisant pour faire une prédiction. On a alors recours aux forêts d'arbre décisionnelles (*Random Forest*, RF). Cette algorithmme agrège les sorties de plusieurs arbres de décision indépendants, chacun prédisant un résultats différent pour un couple d'entrée ($ENT, NOCA$) en fonction du sous-ensemble du LDS avec lequel il a été entraîné. La prédiction de chaque arbre est nécessairement une valeur de LDS. La prédiction de l'ensemble de la forêt est une moyenne, éventuellement pondéré, des réponses de chacun des arbres qui la compose (Figure 76). L'algorithme dispose de plusieurs méta-paramètres permettant de le configurer et de l'adapter à un problème précis, comme par exemple le nombre d'arbres dans la forêt, le nombre de décision au sein d'un même arbre ou encore la profondeur maximale d'un arbre. Un autre avantage de l'algorithme RF est sa flexibilité. Il est capable de gérer à la fois des tâches de régression et de classification avec un haut degré d'exactitude. De plus, il est efficace pour estimer les valeurs manquantes, car il maintient la précision même en présence de données manquantes.

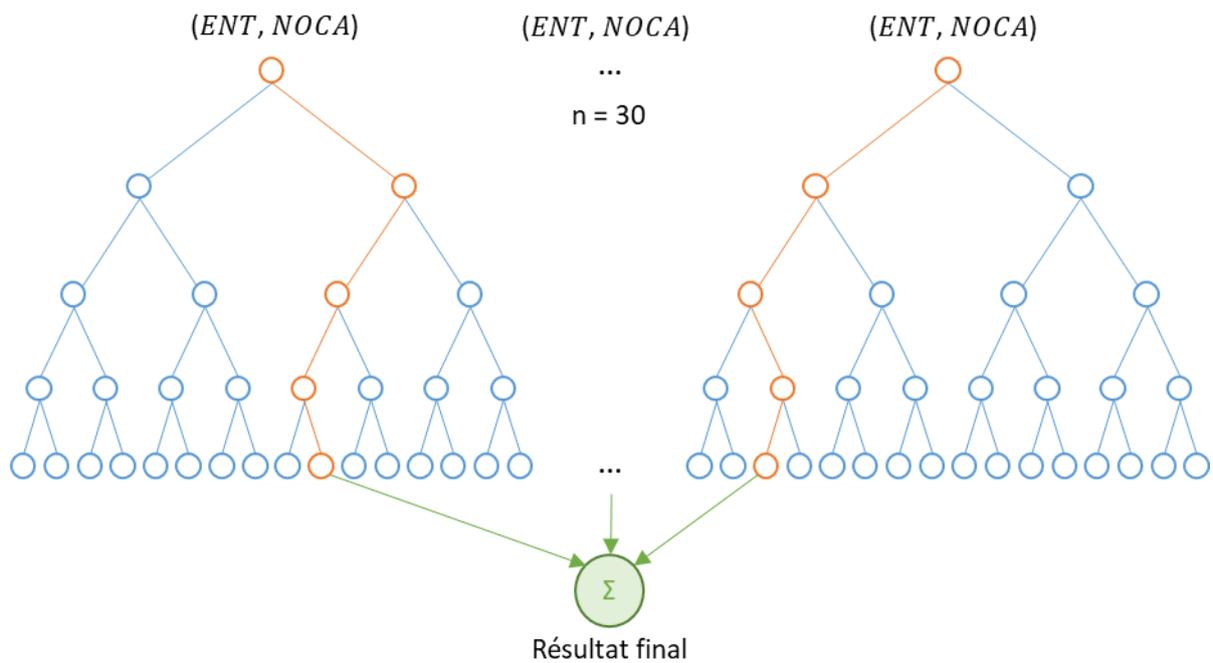


Figure 76 : Exemple de la méthode RN. Sont représentés 30 arbres de décision générés avec la fonction RandomForestRegressor avec 4 embranchements et 16 feuilles chacun. Le parcours dans les arbres de décision est représenté en orange. Le résultat final est la moyenne, pondérée ou non, des sorties des 30 arbres de décisions.

5.4 Réseaux de neurones (NN)

Les NN sont également une méthode d'apprentissage très utilisée dans des domaines très variés. Il s'agit d'une méthode bio-inspirée. Chaque neurone se comporte comme un neurone du vivant, à savoir qu'il agrège un certain nombre de signaux entrant afin de déclencher ou non un signal en sortie. Le modèle en lui-même est composé d'un certain nombre de couches nodales, chacune composée d'un certain nombre de neurones. Le réseau est constitué à minima d'une couche d'entrée constitué de neurone dont les entrées sont les entrées du modèle (ici ENT et $NOCA$), d'une ou plusieurs couches internes dont les entrées sont à chaque fois les sorties de la couche précédente et d'une couche de sortie constituée d'autant de neurones qu'il y a de sorties à prédire et prenant comme entrée les sorties de la dernière couche interne (Figure 77). Le neurone en lui-même réalise une combinaison linéaire de ses entrées $x_k : y = \sum_{k=1}^n a_k \cdot x_k + b$ puis décide de s'activer à un certain niveau ou non selon une fonction d'activation $z = f_{act}(y)$. Le nombre de couche internes, le nombre de neurones sur chaque couche ainsi que la fonction d'activation associée à chaque couche sont autant de méta-paramètres qui peuvent être utilisés pour adapter un NN à son application. Les avantages des NN sont leur capacité à apprendre des relations complexes, leur puissance de traitement, leur capacité à extraire des caractéristiques automatiquement ainsi que le fait de pouvoir gérer plusieurs entrées sans

pour autant avoir une croissance exponentielle de sa complexité. Son principal inconvénient, en particulier pour des applications en biologie, c'est qu'ils nécessitent de grandes quantités de données d'entraînement. Chaque neurone du réseau constitue à lui seul un modèle à $N + 2$ paramètres où N est le nombre d'entrée. Le nombre de paramètre devient assez vite démesuré, même pour des réseaux simples. Évidemment, plus il y a de paramètres, plus il faut de mesures pour ajuster efficacement ces paramètres.

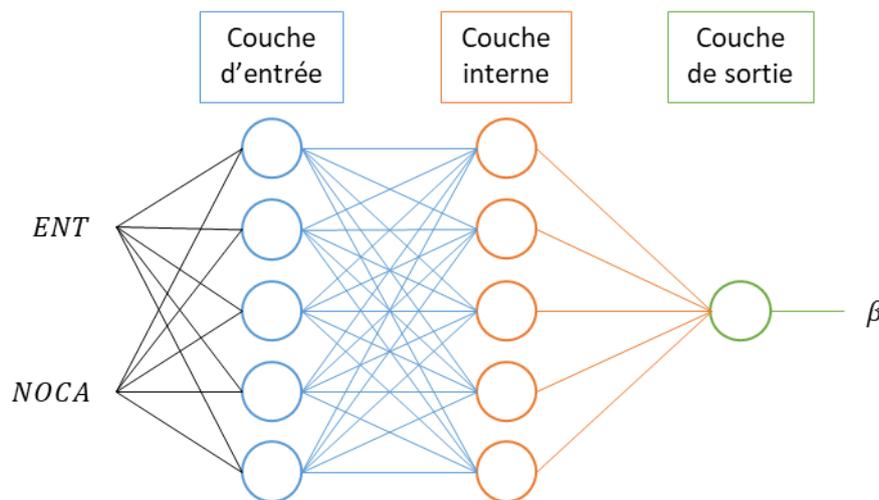


Figure 77 : Exemple de la méthode NN. La couche d'entrée (en bleu) constituée de 5 nœuds prend les paramètres *ENT* et *NOCA*, l'unique couche interne (en orange) constituée de 5 nœuds prend en entrée les sorties de la couche d'entrée, et la couche de sortie (en vert) prend en entrée les sorties de la couche interne et donne en sortie une valeur β .

5.5 Problématique du surapprentissage

Le surapprentissage est un risque fréquent lorsque l'on utilise des modèles de type machine learning. Il se produit lorsque le modèle s'adapte de manière excessive aux données d'apprentissage, au point de mémoriser les exemples spécifiques plutôt que de généraliser les motifs sous-jacents. Cela peut s'assimiler à de l'apprentissage « par cœur » sur le jeu de données pouvant conduire à une baisse drastique de l'efficacité de l'algorithme lorsqu'il est exposé à des jeux de données inédits. À l'inverse, le sous-apprentissage se traduit par le fait que le modèle n'a pas exploré suffisamment l'espace d'apprentissage et se contente donc de réponse assez général, même lorsqu'on lui propose en entrée une donnée très typée. Le cas extrême du sous-apprentissage conduirait un modèle à toujours répondre la valeur moyenne des données d'apprentissage quelque soit l'entrée proposée.

Dans le cas de l'algorithme KNN, des valeurs de k trop faibles peuvent entraîner un surapprentissage des données, tandis que des valeurs de k trop élevées peuvent entraîner un sous-apprentissage. Le

choix approprié de la valeur de k est donc crucial. Elle dépend du jeu de données et doit être établi avec soin.

La méthode RF est moins sujette au surapprentissage que d'autres modèles pour peu qu'on limite le nombre de nœud et/ou le nombre de feuilles de chaque arbre. Si du surapprentissage est détecté, l'augmentation du nombre d'arbres de décision ou la réduction de la profondeur des arbres peut aider à le réduire. Cela se traduit généralement par une plus grande précision, mais peut également entraîner un temps d'apprentissage plus long.

Les NN complexes peuvent être sensibles au surapprentissage. Pour résoudre ce problème, il est souvent recommandé d'entraîner le modèle sur un ensemble de données plus vaste ou de modifier sa complexité en ajustant la structure des nœuds et des couches, ainsi que les poids des paramètres.

Le surapprentissage est un problème courant dans les modèles de machine learning, mais il existe des techniques pour l'identifier et y remédier. L'identification consiste à faire de la validation croisée, c'est-à-dire à entraîner le modèle sur une partie du LDS et utiliser l'autre partie du LDS pour faire de la vérification. Si les performances sur les deux sous-jeux de données sont bonnes et équivalentes, l'apprentissage est bon. Si les performances sur les données utilisés pour l'apprentissage sont bien meilleures que les performances sur le deuxième jeu de données, c'est un signe de sur-apprentissage. Enfin, si les performances sont mauvaises sur les deux jeux de données, on a peut-être à faire à un cas de sous-apprentissage. Dans tous les cas, une sélection appropriée des paramètres et la modification de la complexité du modèle sont des solutions pour y remédier. La prise en compte de ces considérations est essentielle pour garantir des prédictions pertinentes et fiables sur de nouvelles données.

5.6 Modélisation des données de mélanges avec l'approche de machine learning

Nous avons repris les données générées en cultivant la souche *promfoxA-mCherry* en présence de mélanges d'ENT et NOCA présentées en Figure 61 et nous les avons modélisées avec les algorithmes KNN, RF et NN. Pour KNN et RF, le LDS est composé de 30 % de nos données expérimentales sélectionnées au hasard. Pour NN, le LDS est composé de 20 % de nos données expérimentales sélectionnées au hasard pour avoir suffisamment de données à tester. Pour KNN, nous avons utilisé $k = 5$. Pour RF, nous avons utilisé 30 arbres de décisions avec chacun un maximum de 5 embranchements et de 20 feuilles maximum. Pour NN, nous avons utilisé deux paramètres d'entrée, *ENT* et *NOCA*, une couche d'entrée de 5 nœuds avec une fonction d'activation linéaire rectifiée, une unique couche interne de 5 nœuds avec une fonction d'activation linéaire rectifiée et une couche de sortie d'un nœud

avec une fonction d'activation sigmoïde. La représentation des différents modèles sous forme de graphique avec courbes de niveaux est donnée en Figure 78. Pour évaluer la précision de prédiction des modèles, la RMSE est calculée entre les données prédites et les données expérimentales qui n'ont pas été prise pour l'entraînement du modèle. Les valeurs de RMSE pour les différents modèles sont les suivantes : 12,44 % pour KNN, 12,59 % pour RF et 17,02 % pour NN. Ces valeurs de RMSE sont cohérentes avec l'erreur intrinsèque de l'expérimentation.

Les résultats de nos différents modèles démontrent leur pertinence dans la modélisation des données, les courbes de prédiction s'alignent de manière relativement cohérente avec les valeurs réelles et notre première modélisation par interpolation. Sachant que notre jeu de données est restreint en termes de volume et de diversité, il est possible que la puissance réelle des algorithmes ne soit ici pas pleinement représentée. Cependant, malgré cette contrainte, nos premiers résultats sont encourageants et suggèrent que ces modèles sont capables de capturer les tendances de notre système.

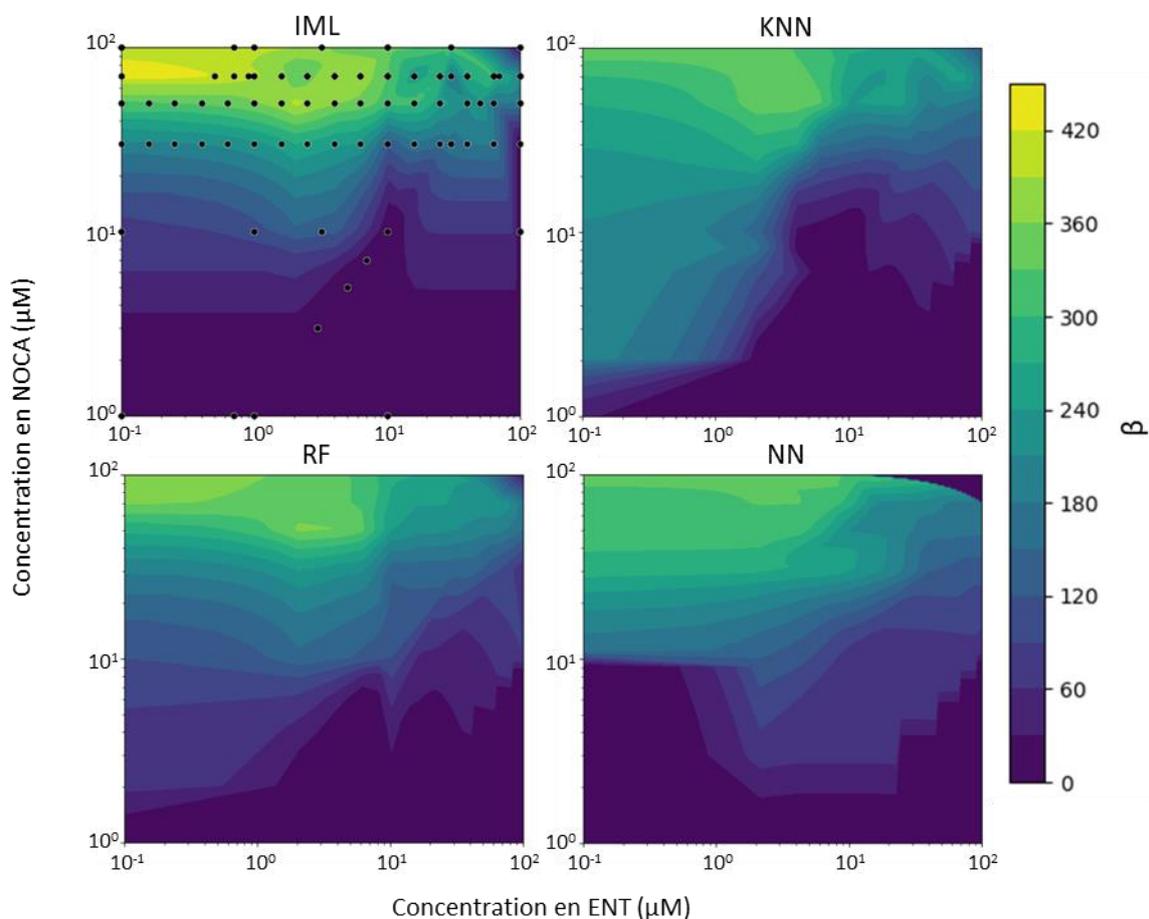


Figure 78 : Comparaison des modèles de production de mCherry par *promfoxA*-mCherry en présence de mélanges d'ENT et NOCA. Les données de mélanges ont été modélisées suivant différents algorithmes : IML (modèle présenté dans la partie Résultats en Figure 61B), KNN, RF et NN. Chaque

courbe de niveau représente une valeur de β selon l'échelle de couleurs en légende. Les graphiques avec courbes de niveaux ont été générés sur Python grâce à la fonction `matplotlib.pyplot.contourf`.

Notre tentative d'établir un modèle mathématique analytique a permis de mettre en évidence les limitatifs de notre approche. Une des limitations initiales réside dans la complexité et l'interdépendance des mécanismes de régulation qui rendent le modèle mathématique très difficile à établir. De plus, pouvoir extraire efficacement les paramètres à partir de résultats expérimentaux dépendants de la concentration de deux sidérophores s'est révélé problématique. Un avantage de l'approche de machine learning est sa précision et sa capacité à prendre en compte facilement de nombreux paramètres différents. Cette nouvelle approche nous a donné des résultats encourageants.

Un modèle analytique a l'avantage d'utiliser des paramètres interprétables mathématiquement et biologiquement, comme par exemple le paramètre K de l'équation de Hill qui est égal la concentration en sidérophore pour être à la moitié de l'expression maximale du transporteur et qui détermine le point d'inflexion de la sigmoïde. Cet aspect est très intéressant pour décrypter les mécanismes biologiques impliqués dans l'effet observé. Les algorithmes de machine learning sont plutôt de type « boîte noire », ce sont des systèmes qui peuvent être visualisés en termes d'entrées et de sorties sans que son fonctionnement interne ne soit transparent pour l'utilisateur. Le principal inconvénient des modèles de ce type est qu'ils peuvent générer des résultats sans que l'on puisse comprendre comment ils y sont parvenus. Cela peut poser des défis en termes de confiance, d'acceptabilité et d'exploitabilité des résultats. Des efforts sont déployés pour développer des techniques et des approches permettant de rendre les modèles de type « boîte noire » plus transparents et explicables, afin de mieux comprendre leurs décisions et de faciliter la confiance et l'adoption de ces technologies. Ces problématiques d'explicabilité sont des sujets de recherche importants et d'actualité regroupés sous le nom d'intelligence artificielle explicative (*Explainable AI*, XAI) (Barredo Arrieta *et al.*, 2020; Dwivedi *et al.*, 2023). Certains outils sont en développement pour répondre à ces enjeux comme par exemple les explications additives de Shapley (*SHapley Additive exPlanations*, SHAP) qui permet de comprendre comment les caractéristiques ou les variables d'entrée contribuent aux prédictions d'un modèle (Lundberg and Lee, 2017). Le principe de base de SHAP est de mesurer la contribution individuelle de chaque caractéristique à la prédiction d'un modèle en considérant toutes les combinaisons possibles de caractéristiques. Pour cela, SHAP évalue comment la prédiction d'un modèle change lorsque différentes caractéristiques sont ajoutées ou retirées. Cette méthode s'avéra intéressante à implémenter dans nos futurs modèles prenant en compte de nombreux paramètres.

Malgré la problématique XAI, les algorithmes de machine learning revêtent un intérêt particulier pour nous, car nous souhaitons développer un modèle de plus en plus complexe qui intègre de multiples variations environnementales de culture de *P. aeruginosa*. Dans cette perspective, nous avons proposé plusieurs pistes de réflexion pour élaborer un modèle et une méthodologie plus pertinents pour notre système en vue des prochaines étapes du projet.

6 Conclusion

Dans le cadre de ce projet de thèse, notre objectif était d'approfondir notre compréhension de l'adaptation phénotypique des voies d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa*. Grâce à l'utilisation de souches rapportrices, nous avons pu explorer plus en détail l'expression de quatre gènes codant pour des TBDT impliqués dans l'import du fer. Nous avons validé la robustesse de ces constructions et la fiabilité de leurs résultats.

Le développement de modèles mathématiques nous a permis d'étudier de manière précise les comportements d'expression des quatre gènes étudiés, offrant ainsi des clés pour la compréhension des mécanismes biologiques. Nous avons utilisé cette approche pour évaluer l'expression de PfeA, FoxA, FpvA et FptA, en présence de différentes concentrations d'exosidérophores. Nos résultats ont révélé des schémas d'expression distincts pour chaque transporteur, même lorsque les sidérophores présentaient des structures et des affinités pour leur TBDT similaires.

Nous avons également démontré que nos souches rapportrices détectaient et répondaient à la présence de sidérophores présents dans les surnageants de culture de bactéries productrices de sidérophores, ouvrant ainsi des opportunités pour des expérimentations plus complexes telles que les co-cultures, les biofilms, les communautés microbiennes ou les systèmes d'infection. De plus, nos expériences avec les mélanges de sidérophores ont mis en évidence des aspects intéressants, notamment la capacité de la NOCA à chélater le fer malgré son affinité plus faible pour le fer comparé à l'ENT ou lorsqu'elle était présente en concentrations plus faible par rapport à l'ENT. Nous avons également identifié les limites de notre modèle analytique, ce qui nous a conduit à explorer des approches de machine learning qui se sont avérées pertinentes et qui seront certainement développées ultérieurement dans le cadre du projet.

Dans l'ensemble, nos résultats soulignent la complexité de la régulation de l'acquisition du fer par *P. aeruginosa*, qui prend en compte de nombreux paramètres. Les approches génétiques, biochimiques et mathématiques que nous avons utilisées nous ont permis d'avoir une nouvelle vision de la complexité qui était liée à l'expression des TBDT et certainement des voies d'import du fer. De

plus, la méthodologie développée ouvre de nouvelles perspectives de recherche. L'utilisation de ces techniques nous permettra d'approfondir notre compréhension des mécanismes de régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du fer chez *P. aeruginosa*, même dans des systèmes complexes.

Pour la suite du projet, notre objectif est d'intégrer les différents modèles dans un modèle global qui inclura une variété de données dans des conditions diverses. En combinant des données expérimentales et des méthodes de modélisation, nous visons à établir une représentation quantitative fiable de l'expression génétique des transporteurs de sidérophores dans des conditions spécifiques et complexes, et par extrapolation de l'expression de tous les gènes impliqués dans ces voies d'import du fer étant donné qu'ils sont souvent localisés sur les mêmes opérons. Cette approche intégrée ouvrira de nouvelles perspectives dans notre compréhension des mécanismes de transport des sidérophores et de leur régulation. De plus, elle servira de base solide pour la conception de sidéromycines artificielles permettant de lutter efficacement contre cette bactérie pathogène.

Bibliographie

Ahmed, S.A.K.S., Rudden, M., Smyth, T.J., Dooley, J.S.G., Marchant, R., Banat, I.M., 2019a. Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 3521–3535. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09618-0>

Al Shaer, D., Al Musaimi, O., de la Torre, B.G., Albericio, F., 2020. Hydroxamate siderophores: Natural occurrence, chemical synthesis, iron binding affinity and use as Trojan horses against pathogens. *Eur. J. Med. Chem.* 208, 112791. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112791>

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*. *Inorg. Chem.* 33, 6391–6402. <https://doi.org/10.1021/ic00104a059>

Albrecht-Gary, A.M., Crumbliss, A.L., 1998. Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Met. Ions Biol. Syst.* 35, 239–327.

Alon, U., 2007. Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat. Rev. Genet.* 8, 450–461. <https://doi.org/10.1038/nrg2102>

Alqarni, B., Colley, B., Klebensberger, J., McDougald, D., Rice, S.A., 2016a. Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Methods* 127, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.008>

Alvarez-Ortega, C., Harwood, C.S., 2007. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol. Microbiol.* 65, 153–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05772.x>

Anderegg, G., L'Eplattenier, F., Schwarzenbach, G., 1963. Hydroxamatkomplexe II. Die Anwendung der pH-Methode. *Helv. Chim. Acta* 46, 1400–1408. <https://doi.org/10.1002/hlca.19630460435>

Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodríguez-Quiñones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 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. *J. Bacteriol.* 176, 307–319. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.307-319.1994>

Aron, A., Petras, D., Schmid, R., Gauglitz, J.M., Büttel, I., Antelo, L., Zhi, H., Saak, C.C., Malarney, K.P., Thines, E., Dutton, R.J., Raffatellu, M., Dorrestein, P.C., 2019. Native Electrospray-based Metabolomics Enables the Detection of Metal-binding Compounds (preprint). *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1101/824888>

Årstøl, E., Hohmann-Marriott, M.F., 2019. Cyanobacterial Siderophores—Physiology, Structure, Biosynthesis, and Applications. *Mar. Drugs* 17, 281. <https://doi.org/10.3390/md17050281>

- Bandyra, K.J., Said, N., Pfeiffer, V., Górna, M.W., Vogel, J., Luisi, B.F., 2012. The seed region of a small RNA drives the controlled destruction of the target mRNA by the endoribonuclease RNase E. *Mol. Cell* 47, 943–953. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.015>
- Barbier, F., Wolff, M., 2010. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* - Vers l'impasse thérapeutique ? *médecine/sciences* 26, 960–968. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102611960>
- Barbier, M., Damron, F.H., Bielecki, P., Suárez-Diez, M., Puchałka, J., Albertí, S., Santos, V.M. dos, Goldberg, J.B., 2014. From the Environment to the Host: Re-Wiring of the Transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* from 22°C to 37°C. *PLOS ONE* 9, e89941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089941>
- Barredo Arrieta, A., Díaz-Rodríguez, N., Del Ser, J., Bennetot, A., Tabik, S., Barbado, A., Garcia, S., Gil-Lopez, S., Molina, D., Benjamins, R., Chatila, R., Herrera, F., 2020. Explainable Artificial Intelligence (XAI): Concepts, taxonomies, opportunities and challenges toward responsible AI. *Inf. Fusion* 58, 82–115. <https://doi.org/10.1016/j.inffus.2019.12.012>
- 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. *Mol. Microbiol.* 47, 195–207. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03288.x>
- Beaume, M., Köhler, T., Fontana, T., Tognon, M., Renzoni, A., van Delden, C., 2015. Metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* involved in competition with respiratory bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 6.
- Behrens, H.M., Lowe, E.D., Gault, J., Housden, N.G., Kaminska, R., Weber, T.M., Thompson, C.M.A., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., Walker, D., Robinson, C.V., Kleanthous, C., 2020. Pyocin S5 Import into *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Generic Mode of Bacteriocin Transport. *mBio* 11, e03230-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03230-19>
- Bellis, G., Dehillotte, C., Lemonnier, L., 2019. French Cystic Fibrosis Registry. Annual data report 2017 (report). *Vaincre la Mucoviscidose* - Ined.
- Biggs, M.B., Papin, J.A., 2013. Novel Multiscale Modeling Tool Applied to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *PLOS ONE* 8, e78011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078011>
- Bonneau, A., Roche, B., Schalk, I.J., 2020. Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Sci. Rep.* 10, 120. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x>
- Bottani, S., Veitia, R.A., 2017. Hill function-based models of transcriptional switches: impact of specific, nonspecific, functional and nonfunctional binding: Modeling of transcriptional switches. *Biol. Rev.* 92, 953–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12262>
- Boukhalfa, H., Crumbliss, A.L., 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport 15.
- Bouvier, M., Sharma, C.M., Mika, F., Nierhaus, K.H., Vogel, J., 2008. Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Mol. Cell* 32, 827–837. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.027>
- 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 Trans.* 41, 2820–2834. <https://doi.org/10.1039/C1DT11804H>

- Braun, V., Hartmann, M.D., Hantke, K., 2022. Transcription regulation of iron carrier transport genes by ECF sigma factors through signaling from the cell surface into the cytoplasm. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, fuac010. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac010>
- Braun, V., Pramanik, A., Gwinner, T., Köberle, M., Bohn, E., 2009. Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 22, 3–13. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9199-7>
- Bredenbruch, F., Geffers, R., Nimtz, M., Buer, J., Häussler, S., 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ. Microbiol.* 8, 1318–1329. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01025.x>
- Breiman, L., 2001. Random Forests. *Mach. Learn.* 45, 5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Brillet, K., Journet, L., Célia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., Cobessi, D., 2007. A β Strand Lock Exchange for Signal Transduction in TonB-Dependent Transducers on the Basis of a Common Structural Motif. *Structure* 15, 1383–1391. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.08.013>
- Brillet, K., Reimann, C., Mislin, G.L.A., Noël, S., Rognan, D., Schalk, I.J., Cobessi, D., 2011. Pyochelin Enantiomers and Their Outer-Membrane Siderophore Transporters in Fluorescent *Pseudomonads*: Structural Bases for Unique Enantiospecific Recognition. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 16503–16509. <https://doi.org/10.1021/ja205504z>
- 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 Chem. Biol.* 7, 2036–2045. <https://doi.org/10.1021/cb300330v>
- Budzikiewicz, H., 2004. Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (Fluorescent and Non-Fluorescent *Pseudomonas* spp.), in: Budzikiewicz, H., Flessner, T., Jautelat, R., Scholz, U., Winterfeldt, E., Herz, W., Falk, H., Kirby, G.W. (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer, Vienna, pp. 81–237. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0581-8_2
- Bush, K., Bradford, P.A., 2016. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Butaitė, E., Kramer, J., Wyder, S., Kümmerli, R., 2018. Environmental determinants of pyoverdine production, exploitation and competition in natural *Pseudomonas* communities. *Environ. Microbiol.* 20, 3629–3642. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14355>
- Carvunis, A.-R., Gomez, E., Thierry-Mieg, N., Trilling, L., Vidal, M., 2009. Biologie systémique - Des concepts d'hier aux découvertes de demain. *médecine/sciences* 25, 578–584. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009256-7578>
- Casadaban, M.J., 1976. Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104, 541–555. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90119-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90119-4)
- Celia, H., 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. *Commun. Biol.* 2, 358. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0604-2>

- Celia, H., 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, 60–65. <https://doi.org/10.1038/nature19757>
- Centola, G., Deredge, D.J., Hom, K., Ai, Y., Dent, A.T., Xue, F., Wilks, A., 2020. Gallium(III)–Salophen as a Dual Inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* Heme Sensing and Iron Acquisition. *ACS Infect. Dis.* 6, 2073–2085. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00138>
- Chan, D.C.K., Burrows, L.L., 2022. *Pseudomonas aeruginosa* FpvB Is a High-Affinity Transporter for Xenosiderophores Ferrichrome and Ferrioxamine B. *mBio* 0, e03149-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.03149-22>
- Chan, D.C.K., Josts, I., Koteva, K., Wright, G.D., Tidow, H., Burrows, L.L., 2022. A single extracellular loop of FoxA controls ligand specificity, uptake, and signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1101/2022.11.18.517105>
- Chelliah, V., Juty, N., Ajmera, I., Ali, R., Dumousseau, M., Glont, M., Hucka, M., Jalowicki, G., Keating, S., Knight-Schrijver, V., Lloret-Villas, A., Natarajan, K.N., Pettit, J.-B., Rodriguez, N., Schubert, M., Wimalaratne, S.M., Zhao, Y., Hermjakob, H., Le Novère, N., Laibe, C., 2015. BioModels: ten-year anniversary. *Nucleic Acids Res.* 43, D542-548. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1181>
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilleley, M.G.J., Orange, N., Dufour, A., Cornelis, P., 2017. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 698–722. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>
- Choi, K.-H., Gaynor, J.B., White, K.G., Lopez, C., Bosio, C.M., Karkhoff-Schweizer, R.R., Schweizer, H.P., 2005. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* 2, 443–448. <https://doi.org/10.1038/nmeth765>
- Cleary, J.L., Kolachina, S., Wolfe, B.E., Sanchez, L.M., 2018. Coproporphyrin III Produced by the Bacterium *Glutamicibacter arilaitensis* Binds Zinc and Is Upregulated by Fungi in Cheese Rinds. *mSystems* 3, e00036-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00036-18>
- Clément, 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, 7954–7965. <https://doi.org/10.1021/bi049768c>
- Cobessi, D., Celia, H., Pattus, F., 2005. Crystal Structure at High Resolution of Ferric-pyochelin and its Membrane Receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 352, 893–904. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.004>
- Cornelis, P., Bodilis, J., 2009. A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 256–262. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00041.x>
- Cornelis, P., Matthijs, S., Van Oeffelen, L., 2009. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 22, 15–22. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9193-0>
- Cornish, A.S., Page, W.J., 1998. The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: their affinity for iron and role in oxygen stress management. *Microbiol. Read. Engl.* 144, 1747–1754. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-7-1747>

- Cover, T., Hart, P., 1967. Nearest neighbor pattern classification. *IEEE Trans. Inf. Theory* 13, 21–27. <https://doi.org/10.1109/TIT.1967.1053964>
- Crespo, A., Blanco-Cabra, N., Torrents, E., 2018. Aerobic Vitamin B12 Biosynthesis Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* Class II Ribonucleotide Reductase Activity During Planktonic and Biofilm Growth. *Front. Microbiol.* 9, 986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00986>
- Crosa, J.H., Walsh, C.T., 2002. Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 223–249. <https://doi.org/10.1128/mubr.66.2.223-249.2002>
- Cuív, P.Ó., Clarke, P., O’Connell, M., 2006. Identification and characterization of an iron-regulated gene, *chtA*, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 152, 945–954. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28552-0>
- Cunrath, O., Gasser, V., Hoegy, F., Reimmann, C., Guillon, L., Schalk, I.J., 2015. A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 17, 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. *Environ. Microbiol.* 18, 3258–3267. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12971>
- Cunrath, O., Graulier, G., Carballido-Lopez, A., Pérard, J., Forster, A., Geoffroy, V.A., Saint Auguste, P., Bumann, D., Mislin, G.L.A., Michaud-Soret, I., Schalk, I.J., Fechter, P., 2020. The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* optimizes the production of the siderophore pyochelin upon environmental challenges†. *Metallomics* 12, 2108–2120. <https://doi.org/10.1039/d0mt00029a>
- Daley, R., 2009. 10. Error Propagation tutorial.
- Dean, C.R., Neshat, S., Poole, K., 1996. PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 178, 5361–5369. <https://doi.org/10.1128/jb.178.18.5361-5369.1996>
- Dean, C R, Poole, K., 1993. Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (*pfeA*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 175, 317–324. <https://doi.org/10.1128/jb.175.2.317-324.1993>
- Dean, Charles R., Poole, K., 1993. Expression of the ferric enterobactin receptor (*PfeA*) of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* 8, 1095–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01654.x>
- 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. *J. Biol. Chem.* 294, 2771–5555. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006185>
- Dockery, J.D., Keener, J.P., 2001. A Mathematical Model for Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Math. Biol.* 63, 95–116. <https://doi.org/10.1006/bulm.2000.0205>
- Dowd, S.E., Sun, Y., Secor, P.R., Rhoads, D.D., Wolcott, B.M., James, G.A., Wolcott, R.D., 2008. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.* 8, 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-43>

- 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*. *Mol. Microbiol.* 82, 1444–1453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07901.x>
- Dumas, Z., Ross-Gillespie, A., Kümmerli, R., 2013. Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20131055. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1055>
- Dunphy, L.J., Yen, P., Papin, J.A., 2019. Integrated Experimental and Computational Analyses Reveal Differential Metabolic Functionality in Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Syst.* 8, 3–14.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.12.002>
- Dwivedi, R., Dave, D., Naik, H., Singhal, S., Omer, R., Patel, P., Qian, B., Wen, Z., Shah, T., Morgan, G., Ranjan, R., 2023. Explainable AI (XAI): Core Ideas, Techniques, and Solutions. *ACM Comput. Surv.* 55, 194:1-194:33. <https://doi.org/10.1145/3561048>
- Eberl, H.J., Collinson, S., 2009. A modeling and simulation study of siderophore mediated antagonism in dual-species biofilms. *Theor. Biol. Med. Model.* 6, 30. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-6-30>
- Elias, S., Degtyar, E., Banin, E., 2011. FvbA is required for vibriobactin utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 157, 2172–2180. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044768-0>
- Enz, S., Mahren, S., Menzel, C., Braun, V., 2003. Analysis of the Ferric Citrate Transport Gene Promoter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185, 2387–2391. <https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2387-2391.2003>
- Fenton, H.J.H., 1894. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65, 899–910. <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>
- Ferguson, A.D., Chakraborty, R., Smith, B.S., Esser, L., van der Helm, D., Deisenhofer, J., 2002. Structural Basis of Gating by the Outer Membrane Transporter FecA. *Science* 295, 1715–1719. <https://doi.org/10.1126/science.1067313>
- Fernandez-López, R., Ruiz, R., de la Cruz, F., Moncalián, G., 2015. Transcription factor-based biosensors enlightened by the analyte. *Front. Microbiol.* 6.
- Fgaier, H., Feher, B., McKellar, R.C., Eberl, H.J., 2008. Predictive modeling of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* under iron limitation. *J. Theor. Biol.* 251, 348–362. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.11.026>
- Francis, J., Macturk, H.M., Madinaveitia, J., Snow, G.A., 1953. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. I. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochem. J.* 55, 596–607. <https://doi.org/10.1042/bj0550596>
- Fritsch, S., Gasser, V., Peukert, C., Pinkert, L., Kuhn, L., Perraud, Q., Normant, V., Brönstrup, M., Schalk, I.J., 2022. Uptake Mechanisms and Regulatory Responses to MECAM- and DOTAM-Based Artificial Siderophores and Their Antibiotic Conjugates in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* 8, 1134–1146. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00049>
- Gaille, C., Reimmann, C., Haas, D., 2003. Isochorismate synthase (PchA), the first and rate-limiting enzyme in salicylate biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 278, 16893–16898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212324200>

- 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 Chem. Biol.* 12, 1056–1065. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01077>
- Garay-Novillo, J.N., García-Morena, D., Ruiz-Masó, J.Á., Barra, J.L., del Solar, G., 2019. Combining Modules for Versatile and Optimal Labeling of Lactic Acid Bacteria: Two pMV158-Family Promiscuous Replicons, a Pneumococcal System for Constitutive or Inducible Gene Expression, and Two Fluorescent Proteins. *Front. Microbiol.* 10.
- García-Cayuela, T., de Cadiñanos, L.P.G., Mohedano, M.L., de Palencia, P.F., Boden, D., Wells, J., Peláez, C., López, P., Requena, T., 2012. Fluorescent protein vectors for promoter analysis in lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 171–181. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4087-z>
- García-Reyes, S., Soberón-Chávez, G., Cocotl-Yanez, M., 2020. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J. Med. Microbiol.* 69, 25–34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001116>
- Garénaux, A., Caza, M., Dozois, C.M., 2011. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol., Special Issue: VETPATH 2010* 153, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.023>
- Gasser, V., Baco, E., Cunrath, O., August, P.S., Perraud, Q., Zill, N., Schleberger, C., Schmidt, A., Paulen, A., Bumann, D., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., 2016. Catechol siderophores repress the pyochelin pathway and activate the enterobactin pathway in *Pseudomonas aeruginosa*: an opportunity for siderophore–antibiotic conjugates development. *Environ. Microbiol.* 18, 819–832. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13199>
- Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., Schalk, Isabelle.J., 2015. Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. *J. Inorg. Biochem., 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC 12) in Zurich, Switzerland, August 24–28, 2014* 148, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.01.017>
- Gasser, V., Kuhn, L., Hubert, T., Aussel, L., Hammann, P., Schalk, I.J., 2021. The Esterase PfeE, the Achilles' Heel in the Battle for Iron between *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2814. <https://doi.org/10.3390/ijms22062814>
- 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 organization of the pyoverdine bio-synthetic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Q. Rev. Biophys.* 53, e1. <https://doi.org/10.1017/S0033583519000155>
- Gauthier, J., Vincent, A.T., Charette, S.J., Derome, N., 2019. A brief history of bioinformatics. *Brief. Bioinform.* 20, 1981–1996. <https://doi.org/10.1093/bib/bby063>
- Gessard, C., 1984. On the Blue and Green Coloration that Appears on Bandages. *Rev. Infect. Dis.* 6, S775–S776. https://doi.org/10.1093/clinids/6.Supplement_3.S775
- Ghssein, G., Brutesco, C., Ouerdane, L., Fojcik, C., Izaute, A., Wang, S., Hajjar, C., Lobinski, R., Lemaire, D., Richaud, P., Voulhoux, R., Espaillet, A., Cava, F., Pignol, D., Borezée-Durant, E., Arnoux, P., 2016. Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in *Staphylococcus aureus*. *Science* 352, 1105–1109. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1018>

- 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*. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 1671–1680. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27035-0>
- Ghysels, B., Ochsner, U., Möllman, 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 Microbiol. Lett.* 246, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.010>
- Gomez, N.O., Tetard, A., Ouerdane, L., Laffont, C., Brutesco, C., Ball, G., Lobinski, R., Denis, Y., Plésiat, P., Llanes, C., Arnoux, P., Voulhoux, R., 2021. Involvement of the *Pseudomonas aeruginosa* MexAB–OprM efflux pump in the secretion of the metallophore pseudopaline. *Mol. Microbiol.* 115, 84–98. <https://doi.org/10.1111/mmi.14600>
- Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., Maire, P., 2008. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22, 633–648. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x>
- Greenwald, J., Nader, M., Celia, H., Gruffaz, C., Geoffroy, V., Meyer, J.-M., Schalk, I.J., Pattus, F., 2009. FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Mol. Microbiol.* 72, 1246–1259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06721.x>
- Guillon, L., El Mecherki, M., Altenburger, S., Graumann, P.L., Schalk, I.J., 2012. High cellular organization of pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: clustering of PvdA at the old cell pole. *Environ. Microbiol.* 14, 1982–1994. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02741.x>
- Haas, A.L., Zemke, A.C., Melvin, J.A., Armbruster, C.R., Hendricks, M.R., Moore, J., Nouraie, S.M., Thibodeau, P.H., Lee, S.E., Bomberger, J.M., 2023. Iron bioavailability regulates *Pseudomonas aeruginosa* interspecies interactions through type VI secretion expression. *Cell Rep.* 42, 112270. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112270>
- Hamed, M.Y., Silver, J., Wilson, M.T., 1983. Studies on the reactions of ferric iron with glutathione and some related thiols. Part III. A study of the iron catalyzed oxidation of glutathione by molecular oxygen. *Inorganica Chim. Acta* 80, 237–244. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)91289-1](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)91289-1)
- 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. *J. Bacteriol.* 192, 1212–1220. <https://doi.org/10.1128/JB.01539-09>
- Hannauer, M., Schäfer, M., Hoegy, F., Gizzi, P., Wehrung, P., Mislin, G.L.A., Budzikiewicz, H., Schalk, I.J., 2012. Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. *FEBS Lett.* 586, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.12.004>
- Hannauer, M., 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 Lett.* 584, 4751–4755. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.051>
- Harrington, J.M., Crumbliss, A.L., 2009. The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 22, 679–689. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9233-4>

Helman, R., Lawrence, G.D., 1989. The increase in ferrioxamine B reduction potential with increasing acidity of the medium. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 22, 187–196. [https://doi.org/10.1016/0302-4598\(89\)87038-2](https://doi.org/10.1016/0302-4598(89)87038-2)

Hennard, C., Truong, Q.C., Desnottes, J.F., Paris, J.M., Moreau, N.J., Abdallah, M.A., 2001. Synthesis and activities of pyoverdine-quinolone adducts: a prospective approach to a specific Therapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Chem.* 44, 2139–2151. <https://doi.org/10.1021/jm990508g>

Hider, R., Aviles, M.V., Chen, Y.-L., Latunde-Dada, G.O., 2021. The Role of GSH in Intracellular Iron Trafficking. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1278. <https://doi.org/10.3390/ijms22031278>

Hider, R.C., Kong, X., 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637. <https://doi.org/10.1039/b906679a>

Hill, A., 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* 40 iv-vii.

Hoang, T.-M., Huang, W., Gans, J., Nowak, E., Barbier, M., Wilks, A., Kane, M.A., Oglesby, A.G., 2023. The heme-responsive PrrH sRNA regulates *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin gene expression. <https://doi.org/10.1101/2023.01.19.524833>

Hoch, J.A., 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 165–170. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00070-9)

Hoe, C.-H., Raabe, C.A., Rozhdestvensky, T.S., Tang, T.-H., 2013. Bacterial sRNAs: regulation in stress. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 303, 217–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.04.002>

Hoegy, F., Celia, H., Mislin, G.L., Vincent, M., Gallay, J., Schalk, I.J., 2005. Binding of Iron-free Siderophore, a Common Feature of Siderophore Outer Membrane Transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa**. *J. Biol. Chem.* 280, 20222–20230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500776200>

Hohnadel, D., Meyer, J.M., 1988. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. *J. Bacteriol.* 170, 4865–4873. <https://doi.org/10.1128/jb.170.10.4865-4873.1988>

Holmqvist, E., Wagner, E.G.H., 2017. Impact of bacterial sRNAs in stress responses. *Biochem. Soc. Trans.* 45, 1203–1212. <https://doi.org/10.1042/BST20160363>

Hopfield, J.J., 1982. Neural Networks and Physical Systems with Emergent Collective Computational Abilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2554–2558.

Hsu, L.M., 2002. Open season on RNA polymerase. *Nat. Struct. Biol.* 9, 502–504. <https://doi.org/10.1038/nsb0702-502>

Hvorup, R.N., Goetz, B.A., Niederer, M., Hollenstein, K., Perozo, E., Locher, K.P., 2007. Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science* 317, 1387–1390. <https://doi.org/10.1126/science.1145950>

Imperi, F., Visca, P., 2013. Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of *Pseudomonas aeruginosa*: a membrane-associated “siderosome.” *FEBS Lett.* 587, 3387–3391. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.039>

- Ingalls, B.P., 2013. *Mathematical Modeling in Systems Biology: An Introduction*. MIT Press.
- Ito, A., Nishikawa, T., Matsumoto, S., Yoshizawa, H., Sato, T., Nakamura, R., Tsuji, M., Yamano, Y., 2016. Siderophore Cephalosporin Cefiderocol Utilizes Ferric Iron Transporter Systems for Antibacterial Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 7396–7401. <https://doi.org/10.1128/AAC.01405-16>
- Ito, A., Sato, T., Ota, M., Takemura, M., Nishikawa, T., Toba, S., Kohira, N., Miyagawa, S., Ishibashi, N., Matsumoto, S., Nakamura, R., Tsuji, M., Yamano, Y., 2017. In Vitro Antibacterial Properties of Cefiderocol, a Novel Siderophore Cephalosporin, against Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, 10.1128/aac.01454-17. <https://doi.org/10.1128/aac.01454-17>
- Janssen, K.H., Corley, J.M., Djapgne, L., Cribbs, J.T., Voelker, D., Slusher, Z., Nordell, R., Regulski, E.E., Kazmierczak, B.I., McMackin, E.W., Yahr, T.L., 2020. Hfq and sRNA 179 Inhibit Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* cAMP-Vfr and Type III Secretion Regulons. *mBio* 11, e00363-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00363-20>
- Jones, R.N., 2010. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 51, S81–S87. <https://doi.org/10.1086/653053>
- Josts, I., Veith, K., Normant, V., Schalk, I.J., Tidow, H., 2021. Structural insights into a novel family of integral membrane siderophore reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2101952118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101952118>
- 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>
- Khan, A., Singh, P., Srivastava, A., 2018. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiol. Res.* 212–213, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Kinzel, O., Budzikiewicz, H., 1999. Synthesis and biological evaluation of a pyoverdine-beta-lactam conjugate: a new type of arginine-specific cross-linking in aqueous solution. *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* 53, 618–625. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.1999.00053.x>
- Kinzel, O., Tappe, R., Gerus, I., Budzikiewicz, H., 1998. The synthesis and antibacterial activity of two pyoverdine-ampicillin conjugates, entering *Pseudomonas aeruginosa* via the pyoverdine-mediated iron uptake pathway. *J. Antibiot. (Tokyo)* 51, 499–507. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.51.499>
- Kitano, H., 2002. Computational systems biology. *Nature* 420, 206–210. <https://doi.org/10.1038/nature01254>
- Klahn, P., Zscherp, R., Jimidar, C.C., 2022. Advances in the Synthesis of Enterobactin, Artificial Analogues, and Enterobactin-Derived Antimicrobial Drug Conjugates and Imaging Tools for Infection Diagnosis. *Synthesis* 3499–3557. <https://doi.org/10.1055/a-1783-0751>
- Knüsel, F., Nüesch, J., 1965. Mechanism of Action of Sideromycins. *Nature* 206, 674–676. <https://doi.org/10.1038/206674a0>
- Konings, A.F., Martin, L.W., Sharples, K.J., Roddam, L.F., Latham, R., Reid, D.W., Lamont, I.L., 2013a. *Pseudomonas aeruginosa* Uses Multiple Pathways To Acquire Iron during Chronic Infection in Cystic Fibrosis Lungs. *Infect. Immun.* 81, 2697–2704. <https://doi.org/10.1128/IAI.00418-13>

- Kotecka, K., Kawalek, A., Kobylecki, K., Bartosik, A.A., 2021. The AraC-Type Transcriptional Regulator GliR (PA3027) Activates Genes of Glycerolipid Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5066. <https://doi.org/10.3390/ijms22105066>
- Laffont, C., Brutesco, C., Hajjar, C., Cullia, G., Fanelli, R., Ouerdane, L., Cavelier, F., Arnoux, P., 2019. Simple rules govern the diversity of bacterial nicotianamine-like metallophores. *Biochem. J.* 476, 2221–2233. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190384>
- Lau, C.K.Y., Krewulak, K.D., Vogel, H.J., 2016. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 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, 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Leinweber, A., Weigert, M., Kümmerli, R., 2018. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* senses and gradually responds to interspecific competition for iron. *Evolution* 72, 1515–1528. <https://doi.org/10.1111/evo.13491>
- Leventhal, G.E., Ackermann, M., Schiessl, K.T., 2019. Why microbes secrete molecules to modify their environment: the case of iron-chelating siderophores. *J. R. Soc. Interface* 16, 20180674. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0674>
- Lhospice, S., Gomez, N.O., Ouerdane, L., Brutesco, C., Ghsein, G., Hajjar, C., Liratni, A., Wang, S., Richaud, P., Blevés, 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. *Sci. Rep.* 7, 17132. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16765-9>
- Lin, J., Cheng, J., Wang, Y., Shen, X., 2018. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 230. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00230>
- 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. *Nat. Commun.* 8, 14888. <https://doi.org/10.1038/ncomms14888>
- Lin, Z., Xu, X., Zhao, S., Yang, X., Guo, J., Zhang, Q., Jing, C., Chen, S., He, Y., 2018. Total synthesis and antimicrobial evaluation of natural albomycins against clinical pathogens. *Nat. Commun.* 9, 3445. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05821-1>
- Linares, J.F., Moreno, R., Fajardo, A., Martínez-Solano, L., Escalante, R., Rojo, F., Martínez, J.L., 2010. The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*: Bacterial metabolism and infection. *Environ. Microbiol.* 12, 3196–3212. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02292.x>
- Lions, J.-L., Peetre, J., 1964. Sur Une Classe D'Espaces D'Interpolation. *Publ. Mathématiques IHÉS* 19, 5–68. <https://doi.org/10.1007/BF02684796>
- Little, A.S., Okkotsu, Y., Reinhart, A.A., Damron, F.H., Barbier, M., Barrett, B., Oglesby-Sherrouse, A.G., Goldberg, J.B., Cody, W.L., Schurr, M.J., Vasil, M.L., Schurr, M.J., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Phosphorylation Status Differentially Regulates Pyocyanin and Pyoverdine Production. *mBio* 9, e02318-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02318-17>

- Liu, J., Quinn, N., Berchtold, G.A., Walsh, C.T., 1990. Overexpression, purification, and characterization of isochorismate synthase (EntC), the first enzyme involved in the biosynthesis of enterobactin from chorismate. *Biochemistry* 29, 1417–1425. <https://doi.org/10.1021/bi00458a012>
- Llamas, M.A., Imperi, F., Visca, P., Lamont, I.L., 2014. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 569–597. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12078>
- Llamas, M.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. *Mol. Microbiol.* 67, 458–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06061.x>
- Llamas, M.A., Sparrius, M., Kloet, R., Jiménez, C.R., Vandenbroucke-Grauls, C., Bitter, W., 2006. The Heterologous Siderophores Ferrioxamine B and Ferrichrome Activate Signaling Pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 1882–1891. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1882-1891.2006>
- Loomis, L.D., Raymond, K.N., 1991. Solution equilibria of enterobactin and metal-enterobactin complexes. *Inorg. Chem.* 30, 906–911. <https://doi.org/10.1021/ic00005a008>
- Lundberg, S., Lee, S.-I., 2017. A Unified Approach to Interpreting Model Predictions. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1705.07874>
- Luscher, A., Gasser, V., Bumann, D., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., Köhler, T., 2022. Plant-Derived Catechols Are Substrates of TonB-Dependent Transporters and Sensitize *Pseudomonas aeruginosa* to Siderophore-Drug Conjugates. *mBio* 13, e01498-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.01498-22>
- Luscher, A., Moynié, L., Auguste, P.S., Bumann, D., Mazza, L., Pletzer, D., Naismith, J.H., Köhler, T., 2018. TonB-Dependent Receptor Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* for Uptake of Siderophore-Drug Conjugates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e00097-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00097-18>
- Ma, J., 2018. Promoter Fusions to Study Gene Expression, in: ELS. American Cancer Society, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000976.pub4>
- Madec, M., Lallement, C., Haiech, J., 2017. Modeling and simulation of biological systems using SPICE language. *PLOS ONE* 12, e0182385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182385>
- Madec, M., Rosati, E., Lallement, C., 2021. Feasibility and reliability of sequential logic with gene regulatory networks. *PLOS ONE* 16, e0249234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249234>
- 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. *Microbiol. Read. Engl.* 155, 305–315. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023531-0>
- Martínez, E., Orihuela, C.J., Campos-Gomez, J., 2022. *Pseudomonas aeruginosa* Secretes the Oxylipin Autoinducer Synthases OdsA and OdsB via the Xcp Type 2 Secretion System. *J. Bacteriol.* 204, e0011422. <https://doi.org/10.1128/jb.00114-22>
- Mastropasqua, M.C., D’Orazio, M., Cerasi, M., Pacello, F., Gismondi, A., Canini, A., Canuti, L., Consalvo, A., Ciavardelli, D., Chirullo, B., Pasquali, P., Battistoni, A., 2017. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in zinc poor environments is promoted by a nicotianamine-related metallophore. *Mol. Microbiol.* 106, 543–561. <https://doi.org/10.1111/mmi.13834>

- McFarlane, J.S., Davis, C.L., Lamb, A.L., 2018. Staphylopine, pseudopaline, and yersinopine dehydrogenases: A structural and kinetic analysis of a new functional class of opine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 293, 8009–8019. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002007>
- McFarlane, J.S., Lamb, A.L., 2017. Biosynthesis of an Opine Metallophore by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 56, 5967–5971. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00804>
- Mejía-Almonte, C., Busby, S.J.W., Wade, J.T., van Helden, J., Arkin, A.P., Stormo, G.D., Eilbeck, K., Palsson, B.O., Galagan, J.E., Collado-Vides, J., 2020. Redefining fundamental concepts of transcription initiation in bacteria. *Nat. Rev. Genet.* 21, 699–714. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0254-8>
- Meneely, K.M., Luo, Q., Dhar, P., Lamb, A.L., 2013. Lysine221 is the general base residue of the isochorismate synthase from *Pseudomonas aeruginosa* (PchA) in a reaction that is diffusion limited. *Arch. Biochem. Biophys.* 538, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.07.026>
- Meyer, J.-M., 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* 174, 135–142. <https://doi.org/10.1007/s002030000188>
- Meyer, J.M., Abdallah, M.A.Y. 1978, 1978. The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Microbiology* 107, 319–328. <https://doi.org/10.1099/00221287-107-2-319>
- Meyer, J.-M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., Budzikiewicz, H., 1997. Use of Siderophores to Type Pseudomonads: The Three *Pseudomonas aeruginosa* Pyoverdine Systems. *Microbiology* 143, 35–43. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-35>
- Michel, L., González, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T., Reimann, C., 2005. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol. Microbiol.* 58, 495–509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04837.x>
- Miethke, M., Marahiel, M.A., 2007. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 71, 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
- 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*. *J. Mol. Biol.* 357, 1437–1448. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.080>
- Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., 2014. Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Met. Integr. Biometal Sci.* 6, 408–420. <https://doi.org/10.1039/c3mt00359k>
- Mohedano, M.L., García-Cayuela, T., Pérez-Ramos, A., Gaiser, R.A., Requena, T., López, P., 2015. Construction and validation of a mCherry protein vector for promoter analysis in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 247–253. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1567-4>
- Molina-Henares, A.J., Krell, T., Eugenia Guazzaroni, M., Segura, A., Ramos, J.L., 2006. Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 157–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00008.x>
- Motta, S., Pappalardo, F., 2013. Mathematical modeling of biological systems. *Brief. Bioinform.* 14, 411–422. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs061>

- Mouriño, S., Giardina, B.J., Reyes-Caballero, H., Wilks, A., 2016. Metabolite-driven Regulation of Heme Uptake by the Biliverdin IX β / δ -Selective Heme Oxygenase (HemO) of *Pseudomonas aeruginosa**. *J. Biol. Chem.* 291, 20503–20515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.728527>
- Moynié, L., Hoegy, F., Milenkovic, S., Munier, M., Paulen, A., Gasser, V., Faucon, A.L., Zill, N., Naismith, J.H., Ceccarelli, M., Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., 2022. Hijacking of the Enterobactin Pathway by a Synthetic Catechol Vector Designed for Oxazolidinone Antibiotic Delivery in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* 8, 1894–1904. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00202>
- Moynié, L., Luscher, A., Rolo, D., Pletzer, D., Tortajada, A., Weingart, H., Braun, Y., Page, M.G.P., Naismith, J.H., Köhler, T., 2017. Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e02531-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02531-16>
- Moynié, 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. *Nat. Commun.* 10, 3673. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11508-y>
- Müller, S.I., Valdebenito, M., Hantke, K., 2009. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 22, 691–695. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9217-4>
- Muselius, B., Sukumaran, A., Yeung, J., Geddes-McAlister, J., 2020. Iron Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Defines New Roles for Lon Protease in Homeostasis and Degradation by Quantitative Proteomics. *Front. Microbiol.* 11, 546. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00546>
- Nader, M., Dobbelaere, W., Vincent, M., Journet, L., Adams, H., Cobessi, D., Gallay, J., Schalk, I.J., 2007. Identification of Residues of FpvA Involved in the Different Steps of Pvd-Fe Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 46, 11707–11717. <https://doi.org/10.1021/bi700997w>
- Neilands, J.B., 1953. AN ASSAY METHOD FOR FERRICHROME. *J. Biol. Chem.* 205, 643–646. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)49207-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49207-1)
- Neugebauer, H., Herrmann, C., Kammer, W., Schwarz, G., Nordheim, A., Braun, V., 2005. ExbBD-Dependent Transport of Maltodextrins through the Novel MalA Protein across the Outer Membrane of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 187, 8300–8311. <https://doi.org/10.1128/JB.187.24.8300-8311.2005>
- Nguyen, A.W., Daugherty, P.S., 2005. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat. Biotechnol.* 23, 355–360. <https://doi.org/10.1038/nbt1066>
- Noël, S., Gasser, V., Pesset, B., Hoegy, F., Rognan, D., Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., 2011. Synthesis and biological properties of conjugates between fluoroquinolones and a N3'-functionalized pyochelin. *Org. Biomol. Chem.* 9, 8288–8300. <https://doi.org/10.1039/c1ob06250f>
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., Buchanan, S.K., 2010. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 43–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>
- Nordgård, O., Kvaløy, J.T., Farmen, R.K., Heikkilä, R., 2006. Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: The balance between accuracy and precision. *Anal. Biochem.* 356, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.06.020>

Normant, V., Josts, I., Kuhn, L., Perraud, Q., Fritsch, S., Hammann, P., Mislin, G.L.A., Tidow, H., Schalk, I.J., 2020. Nocardamine-Dependent Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Exclusive Involvement of the FoxA Outer Membrane Transporter. *ACS Chem. Biol.* 15, 2741–2751. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00535>

Normant, V., Kuhn, L., Munier, M., Hammann, P., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., 2022. How the Presence of Hemin Affects the Expression of the Different Iron Uptake Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* Cells. *ACS Infect. Dis.* 8, 183–196. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00525>

Ó Cuív, 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. *J. Bacteriol.* 186, 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. *J. Bacteriol.* 189, 284–287. <https://doi.org/10.1128/JB.01142-06>

Ochsner, U.A., Johnson, Z., Vasil, M.L., 2000. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa* The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF055999, AF127222, and AF127223. *Microbiology* 146, 185–198. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-1-185>

Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2002. GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* 45, 1277–1287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03084.x>

Oglesby, A.G., Farrow, J.M., Lee, J.-H., Tomaras, A.P., Greenberg, E.P., Pesci, E.C., Vasil, M.L., 2008. The Influence of Iron on *Pseudomonas aeruginosa* Physiology: A REGULATORY LINK BETWEEN IRON AND QUORUM SENSING*. *J. Biol. Chem.* 283, 15558–15567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707840200>

Otero-Asman, J.R., García-García, A.I., Civantos, C., Quesada, J.M., Llamas, M.A., 2019a. *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem. *Environ. Microbiol.* 21, 4629–4647. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14773>

Otero-Asman, J.R., Wettstadt, S., Bernal, P., Llamas, M.A., 2019b. Diversity of extracytoplasmic function sigma (σ ECF) factor-dependent signaling in *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 112, 356–373. <https://doi.org/10.1111/mmi.14331>

O’Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>

Pasqua, M., Visaggio, D., Lo Sciuto, A., Genah, S., Banin, E., Visca, P., Imperi, F., 2017. Ferric Uptake Regulator Fur Is Conditionally Essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 199, e00472-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00472-17>

Patzer, S.I., Hantke, K., 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28, 1199–1210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00883.x>

Pederick, V.G., Eijkelkamp, B.A., Begg, S.L., Ween, M.P., McAllister, L.J., Paton, J.C., McDevitt, C.A., 2015. ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 5, 13139. <https://doi.org/10.1038/srep13139>

- Pei, X.Y., Dendooven, T., Sonnleitner, E., Chen, S., Bläsi, U., Luisi, B.F., 2019. Architectural principles for Hfq/Crc-mediated regulation of gene expression. *eLife* 8, e43158. <https://doi.org/10.7554/eLife.43158>
- Peng, J., Chen, G., Xu, X., Wang, T., Liang, H., 2020. Iron facilitates the RetS-Gac-Rsm cascade to inversely regulate protease IV (piv) expression via the sigma factor PvdS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 22, 5402–5413. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15270>
- Pérard, J., Covès, J., Castellan, M., Solard, C., Savard, M., Miras, R., Galop, S., Signor, L., Crouzy, S., Michaud-Soret, I., de Rosny, E., 2016. Quaternary Structure of Fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. *Biochemistry* 55, 1503–1515. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01061>
- Perraud, Q., Cantero, P., Munier, M., Hoegy, F., Zill, N., Gasser, V., Mislin, G.L.A., Ehret-Sabatier, L., Schalk, I.J., 2020a. Phenotypic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in the Presence of Siderophore-Antibiotic Conjugates during Epithelial Cell Infection. *Microorganisms* 8, E1820. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111820>
- 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., 2020b. Phenotypic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Mol. Cell. Proteomics* 19, 589–607. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001829>
- Perraud, Q., Kuhn, L., Fritsch, S., Graulier, G., Gasser, V., Normant, V., Hammann, P., Schalk, I.J., 2022. Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 24, 878–893. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15372>
- 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 Chem. Biol.* 13, 2603–2614. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00543>
- Persmark, M., Pittman, P., Buyer, J.S., Schwyn, B., Jr, P.R.G., Neilands, J.B., 2002. Isolation and structure of rhizobactin 1021, a siderophore from the alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021 [WWW Document]. *ACS Publ.* <https://doi.org/10.1021/ja00063a014>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pinkert, L., Lai, Y.-H., Peukert, C., Hotop, S.-K., Karge, B., Schulze, L.M., Grunenberg, J., Brönstrup, M., 2021. Antibiotic Conjugates with an Artificial MECAM-Based Siderophore Are Potent Agents against Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Pathogens. *J. Med. Chem.* 64, 15440–15460. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01482>
- Pletzer, D., Braun, Y., Weingart, H., 2016. Swarming motility is modulated by expression of the putative xenosiderophore transporter SppR-SppABCD in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109, 737–753. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0675-8>
- Podschun, R., Fischer, A., Ullmann, U., 1992. Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. *Zentralblatt Bakteriol. Int. J. Med. Microbiol.* 276, 481–486. [https://doi.org/10.1016/s0934-8840\(11\)80673-0](https://doi.org/10.1016/s0934-8840(11)80673-0)
- Poole, K., Neshat, S., Krebs, K., Heinrichs, D.E., 1993. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 175, 4597–4604. <https://doi.org/10.1128/jb.175.15.4597-4604.1993>

- Poole, K., Young, L., Neshat, S., 1990. Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 172, 6991–6996.
- Popat, R., Harrison, F., da Silva, A.C., Easton, S.A.S., McNally, L., Williams, P., Diggle, S.P., 2017. Environmental modification via a quorum sensing molecule influences the social landscape of siderophore production. Proc. Biol. Sci. 284, 20170200. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0200>
- Potvin, E., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., 2008. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Rev. 32, 38–55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00092.x>
- Pramanik, A., Braun, V., 2006. Albomycin Uptake via a Ferric Hydroxamate Transport System of *Streptococcus pneumoniae* R6. J. Bacteriol. 188, 3878–3886. <https://doi.org/10.1128/JB.00205-06>
- Pramanik, A., Stroeher, U.H., Krejci, J., Standish, A.J., Bohn, E., Paton, J.C., Autenrieth, I.B., Braun, V., 2007. Albomycin is an effective antibiotic, as exemplified with *Yersinia enterocolitica* and *Streptococcus pneumoniae*. Int. J. Med. Microbiol. IJMM 297, 459–469. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.002>
- 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. J. Bacteriol. 189, 6372–6381. <https://doi.org/10.1128/JB.00505-07>
- Prinz, H., 2009. Hill coefficients, dose–response curves and allosteric mechanisms. J. Chem. Biol. 3, 37–44. <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0029-3>
- Punchi Hewage, A.N.D., Fontenot, L., Guidry, J., Weldeghiorghis, T., Mehta, A.K., Donnarumma, F., Rivera, M., 2020. Mobilization of Iron Stored in Bacterioferritin Is Required for Metabolic Homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. Pathogens 9, 980. <https://doi.org/10.3390/pathogens9120980>
- Rabsch, W., Ma, L., Wiley, G., Najar, F.Z., Kaserer, W., Schuerch, D.W., Klebba, J.E., Roe, B.A., Gomez, J.A.L., Schallmeyer, M., Newton, S.M.C., Klebba, P.E., 2007. FepA- and TonB-Dependent Bacteriophage H8: Receptor Binding and Genomic Sequence. J. Bacteriol. 189, 5658–5674. <https://doi.org/10.1128/JB.00437-07>
- Rampioni, G., Falcone, M., Heeb, S., Frangipani, E., Fletcher, M.P., Dubern, J.-F., Visca, P., Leoni, L., Cámara, M., Williams, P., 2016. Unravelling the Genome-Wide Contributions of Specific 2-Alkyl-4-Quinolones and PqsE to Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. PLOS Pathog. 12, e1006029. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006029>
- Ratledge, C., 2007. Iron Metabolism and Infection. Food Nutr. Bull. 28, S515–S523. <https://doi.org/10.1177/156482650702845405>
- Ratliff, A.C., Buchanan, S.K., Celia, H., 2022. The Ton Motor. Front. Microbiol. 13, 852955. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.852955>
- Rédly, G.A., Poole, K., 2003. Pyoverdine-Mediated Regulation of FpvA Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a Probable Extracytoplasmic-Function Sigma Factor, Fpvl. J. Bacteriol. 185, 1261–1265. <https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1261-1265.2003>
- 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*. J. Bacteriol. 183, 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*. *J. Bacteriol.* 186, 6367–6373. <https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6367-6373.2004>
- Reimmann, C., Serino, L., Beyeler, M., Haa, D., 1998. Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 144, 3135–3148. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3135>
- 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 prrF-Encoded Small Regulatory RNAs Are Required for Iron Homeostasis and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 83, 863. <https://doi.org/10.1128/IAI.02707-14>
- Reynolds, D.M., Waksman, S.A., 1948. Grisein, an Antibiotic Produced by Certain Strains of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 55, 739–752. <https://doi.org/10.1128/jb.55.5.739-752.1948>
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., Mekalanos, J.J., 2005. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 8006–8011. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503005102>
- Ringel, M.T., Brüser, T., 2018. The biosynthesis of pyoverdines. *Microb. Cell Graz Austria* 5, 424–437. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.649>
- Rivault, F., Liébert, C., Burger, A., Hoegy, F., Abdallah, M.A., Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., 2007. Synthesis of pyochelin-norfloxacin conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 640–644. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.11.005>
- Roche, B., Garcia-Rivera, M.A., Normant, V., Kuhn, L., Hammann, P., Brönstrup, M., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., 2021. A role for PCHH as the ABC transporter in iron acquisition by the siderophore pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 24, 866–877. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15811>
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., Foglino, M., 2000. Cell signalling by oligosaccharides. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* 8, 498–504. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01833-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01833-3)
- Ronnebaum, T.A., Lamb, A.L., 2018. Nonribosomal peptides for iron acquisition: pyochelin biosynthesis as a case study. *Curr. Opin. Struct. Biol., Protein–nucleic acid interactions • Catalysis and regulation* 53, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.01.015>
- Ronnebaum, T.A., McFarlane, J.S., Prinszano, T.E., Booker, S.J., Lamb, A.L., 2019. Stuffed Methyltransferase Catalyzes the Penultimate Step of Pyochelin Biosynthesis. *Biochemistry* 58, 665–678. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00716>
- Sánchez, M., Sabio, L., Gálvez, N., Capdevila, M., Dominguez-Vera, J.M., 2017. Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life* 69, 382–388. <https://doi.org/10.1002/iub.1602>
- Sánchez-Hevia, D.L., Yuste, L., Moreno, R., Rojo, F., 2018. Influence of the Hfq and Crc global regulators on the control of iron homeostasis in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 20, 3484–3503. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14263>

Sanderson, T.J., Black, C.M., Southwell, J.W., Wilde, E.J., Pandey, A., Herman, R., Thomas, G.H., Boros, E., Duhme-Klair, A.-K., Routledge, A., 2020. A Salmochelin S4-Inspired Ciprofloxacin Trojan Horse Conjugate. *ACS Infect. Dis.* 6, 2532–2541. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00568>

Santillán, M., 2008. On the Use of the Hill Functions in Mathematical Models of Gene Regulatory Networks. *Math. Model. Nat. Phenom.* 3, 85–97. <https://doi.org/10.1051/mmnp:2008056>

Santoro, S., Paganin, C., Gilardi, S., Brignoli, T., Bertoni, G., Ferrara, S., 2023. Multifaceted Interplay between Hfq and the Small RNA GssA in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 14, e0241822. <https://doi.org/10.1128/mbio.02418-22>

Savli, H., Karadenizli, A., Kolayli, F., Gundes, S., Ozbek, U., Vahaboglu, H., 2003a. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J. Med. Microbiol.* 52, 403–408. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05132-0>

Schalk, I.J., Abdallah, M.A., Pattus, F., 2002. Recycling of Pyoverdinin on the FpvA Receptor after Ferric Pyoverdinin Uptake and Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 41, 1663–1671. <https://doi.org/10.1021/bi0157767>

Schalk, I.J., Guillon, L., 2013. 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. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1468-2>

Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., Brillet, K., 2012. Chapter Two - Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore–Iron Outer Membrane Transporters, in: Argüello, J.M., Lutsenko, S. (Eds.), *Current Topics in Membranes, Metal Transporters*. Academic Press, pp. 37–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1>

Schalk, I.J., Perraud, Q., 2023. *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environ. Microbiol.* n/a. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16328>

Schalk, I.J., Rigouin, C., Godet, J., 2020. An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent Pseudomonads and new insights into their complex cellular organization. *Environ. Microbiol.* 22, 1447–1466. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14937>

Schiessl, K.T., Janssen, E.M.-L., Kraemer, S.M., McNeill, K., Ackermann, M., 2017. Magnitude and Mechanism of Siderophore-Mediated Competition at Low Iron Solubility in the *Pseudomonas aeruginosa* Pyochelin System. *Front. Microbiol.* 8.

Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., Hornischer, K., Bruchmann, S., Düvel, J., Häussler, S., 2015. Elucidation of Sigma Factor-Associated Networks in *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Modular Architecture with Limited and Function-Specific Crosstalk. *PLoS Pathog.* 11, e1004744. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004744>

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*. *J. Bacteriol.* 179, 248–257. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.248-257.1997>

Shultis, D.D., Purdy, M.D., Banchs, C.N., Wiener, M.C., 2006. Outer Membrane Active Transport: Structure of the BtuB:TonB Complex. *Science* 312, 1396–1399. <https://doi.org/10.1126/science.1127694>

- Smith, A.D., Wilks, A., 2015. Differential contributions of the outer membrane receptors PhuR and HasR to heme acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 290, 7756–7766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633495>
- Sonnleitner, E., Bläsi, U., 2014. Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression. *PLoS Genet.* 10, e1004440. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004440>
- Stelling, J., 2004. Mathematical models in microbial systems biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.004>
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N., 2000. Two-Component Signal Transduction.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M.V., 2000a. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–64.
- Strateva, T., Mitov, I., 2011. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann. Microbiol.* 61, 717–732. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0273-y>
- Thi, M.T.T., Wibowo, D., Rehm, B.H.A., 2020. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Thulasiraman, P., Newton, S.M.C., Xu, J., Raymond, K.N., Mai, C., Hall, A., Montague, M.A., Klebba, P.E., 1998. Selectivity of Ferric Enterobactin Binding and Cooperativity of Transport in Gram-Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* 180, 6689–6696. <https://doi.org/10.1128/JB.180.24.6689-6696.1998>
- Torres, N.V., Santos, G., 2015. The (Mathematical) Modeling Process in Biosciences. *Front. Genet.* 6.
- Trouillon, J., Imbert, L., Villard, A.-M., Vernet, T., Attrée, I., Elsen, S., 2021. Determination of the two-component systems regulatory network reveals core and accessory regulations across *Pseudomonas aeruginosa* lineages. *Nucleic Acids Res.* 49, 11476–11490. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab928>
- Troxell, B., Hassan, H.M., 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 59. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>
- Tsang, K.W., Ng, P., Ho, P.L., Chan, S., Tipoe, G., Leung, R., Sun, J., Ho, J.C., Ip, M.S., Lam, W.K., 2003. Effects of erythromycin on *Pseudomonas aeruginosa* adherence to collagen and morphology in vitro. *Eur. Respir. J.* 21, 401–406. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00050903>
- Tsuji, A., Kaneko, Y., Takahashi, K., Ogawa, M., Goto, S., 1982. The Effects of Temperature and pH on the Growth of Eight Enteric and Nine Glucose Non-Fermenting Species of Gram-Negative Rods. *Microbiol. Immunol.* 26, 15–24. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1982.tb00149.x>
- Tyson, J.J., Chen, K., Novak, B., 2001. Network dynamics and cell physiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 908–916. <https://doi.org/10.1038/35103078>
- van Delden, C., Page, M.G.P., Köhler, T., 2013. Involvement of Fe Uptake Systems and AmpC β -Lactamase in Susceptibility to the Siderophore Monosulfactam BAL30072 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2095–2102. <https://doi.org/10.1128/AAC.02474-12>

- van Oeffelen, L., Cornelis, P., Van Delm, W., De Ridder, F., De Moor, B., Moreau, Y., 2008. Detecting cis-regulatory binding sites for cooperatively binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 36, e46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn140>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- 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*. *FEBS J.* 287, 295–309. <https://doi.org/10.1111/febs.15004>
- Visca, P., Imperi, F., Lamont, I.L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>
- Wagner, E.G.H., Romby, P., 2015. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv. Genet.* 90, 133–208. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.05.001>
- Wang, M., Zhang, Y., Lv, L., Kong, D., Niu, G., 2022. Biosynthesis and Chemical Synthesis of Albomycin Nucleoside Antibiotics. *Antibiotics* 11, 438. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040438>
- 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. *J. Bacteriol.* 193, 3606–3617. <https://doi.org/10.1128/JB.00396-11>
- Waters, L.S., Storz, G., 2009. Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* 136, 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Wencewicz, T.A., Long, T.E., Möllmann, U., Miller, M.J., 2013. Trihydroxamate Siderophore–Fluoroquinolone Conjugates Are Selective Sideromycin Antibiotics that Target *Staphylococcus aureus*. *Bioconjug. Chem.* 24, 473–486. <https://doi.org/10.1021/bc300610f>
- Wencewicz, T.A., Miller, M.J., 2018. Sideromycins as Pathogen-Targeted Antibiotics, in: Fisher, J.F., Mobashery, S., Miller, M.J. (Eds.), *Antibacterials: Volume II, Topics in Medicinal Chemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 151–183. https://doi.org/10.1007/7355_2017_19
- Wiener, M.C., 2005. TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Curr. Opin. Struct. Biol., Membranes/Engineering and design* 15, 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.07.001>
- Wilson, T., Mouriño, S., Wilks, A., 2021. The heme-binding protein PhuS transcriptionally regulates the *Pseudomonas aeruginosa* tandem sRNA prrF1,F2 locus. *J. Biol. Chem.* 296, 100275. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100275>
- Xu, Z., Islam, S., Wood, T.K., Huang, Z., 2015. An Integrated Modeling and Experimental Approach to Study the Influence of Environmental Nutrients on Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMed Res. Int.* 2015, e506782. <https://doi.org/10.1155/2015/506782>
- Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T., Ueda, K., 2005. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and

development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* 151, 2899–2905. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28139-0>

Yang, J., Tauschek, M., Robins-Browne, R.M., 2011. Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Trends Microbiol.* 19, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.12.001>

Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., Schalk, I.J., 2010a. Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* 38, 1447–1459. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0358-0>

Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L., Schalk, I.J., 2010b. An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 412–418. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00115.x>

Yoneyama, H., Nakae, T., 1996. Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. *Microbiol. Read. Engl.* 142 (Pt 8), 2137–2144. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-8-2137>

Yoon, S.M., Namkung, W., Lee, J., 2013. A comparison of Ypet and firefly luciferase as reporter proteins for high-throughput screening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 2328–2330. <https://doi.org/10.1271/bbb.130537>

Yukl, E.T., Jepkorir, G., Alontaga, A.Y., Pautsch, L., Rodriguez, J.C., Rivera, M., Moëne-Loccoz, P., 2010. Kinetic and Spectroscopic Studies of Hemin Acquisition in the Hemophore HasAp from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 49, 6646–6654. <https://doi.org/10.1021/bi100692f>

Zähner, H., Bachmann, E., Hütter, R., Nüesch, J., 1962. Sideramine, eisenhaltige Wachstumsfaktoren aus Mikroorganismen. *Pathobiology* 25, 708–736. <https://doi.org/10.1159/000161327>

Zähner, H., Diddens, H., Keller-Schierlein, W., Nägeli, H.U., 1977. Some experiments with semisynthetic sideromycins. *Jpn. J. Antibiot.* 30 Suppl, 201–206.

Zamri, A., Abdallah, M.A., 2000. An Improved Stereocontrolled Synthesis of Pyochelin, Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Tetrahedron* 56, 249.

Zeng, Y., Roy, H., Patil, P.B., Ibba, M., Chen, S., 2009. Characterization of Two Seryl-tRNA Synthetases in Albomycin-Producing *Streptomyces* sp. Strain ATCC 700974. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4619–4627. <https://doi.org/10.1128/AAC.00782-09>

Zhang, Yifan, Edmonds, K.A., Raines, D.J., Murphy, B.A., Wu, H., Guo, C., Nolan, E.M., VanNieuwenhze, M.S., Duhme-Klair, A.-K., Giedroc, D.P., 2020. The Pneumococcal Iron Uptake Protein A (PiuA) Specifically Recognizes Tetradentate FeIIIbis- and Mono-Catechol Complexes. *J. Mol. Biol.* 432, 5390–5410. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.005>

Zhang, Yulin, Li, Y., Zeng, J., Chang, Y., Han, S., Zhao, J., Fan, Y., Xiong, Z., Zou, X., Wang, C., Li, B., Li, H., Han, J., Liu, X., Xia, Y., Lu, B., Cao, B., 2020. Risk Factors for Mortality of Inpatients with *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia in China: Impact of Resistance Profile in the Mortality. *Infect. Drug Resist.* 13, 4115–4123. <https://doi.org/10.2147/IDR.S268744>

Zheng, P., Sun, J., Geffers, R., Zeng, A.-P., 2007. Functional characterization of the gene PA2384 in large-scale gene regulation in response to iron starvation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol., In*

Memoriam W.-D. Deckwer: Merging Process Engineering and Systems Biology 132, 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.013>

Zhu, Y., Czauderna, T., Zhao, J., Klapperstueck, M., Maifiah, M.H.M., Han, M.-L., Lu, J., Sommer, B., Velkov, T., Lithgow, T., Song, J., Schreiber, F., Li, J., 2018. Genome-scale metabolic modeling of responses to polymyxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *GigaScience* 7, giy021. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy021>

Zscherp, R., Coetzee, J., Vornweg, J., Grunenberg, J., Herrmann, J., Müller, R., Klahn, P., 2021. Biomimetic enterobactin analogue mediates iron-uptake and cargo transport into *E. coli* and *P. aeruginosa*. *Chem. Sci.* 12, 10179–10190. <https://doi.org/10.1039/D1SC02084F>

Zschiedrich, C.P., Keidel, V., Szurmant, H., 2016. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J. Mol. Biol., Molecular Basis of Signal Transduction* 428, 3752–3775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>

Zubair, M., Khan, F.A., Menghwar, H., Faisal, M., Ashraf, M., Rasheed, M.A., Marawan, M.A., Dawood, A., Chen, Y., Chen, H., Guo, A., 2020. Progresses on bacterial secretomes enlighten research on *Mycoplasma* secretome. *Microb. Pathog.* 144, 104160. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104160>

Annexes

Tableau 7 : Souches et plasmides utilisés dans ce travail.

Souches et plasmides	N° Collection	Caractéristiques	Références
<i>P. aeruginosa</i>			
PAO1	PAO1	Souche <i>P. aeruginosa</i> WT	(Stover <i>et al.</i> , 2000)
prom <i>pfeA</i> -mCherry	PAS1111	PAO1 avec la séquence promotrice de <i>pfeA</i> suivie de <i>mCherry</i> insérée dans le génome	Ce travail
prom <i>foxA</i> -mCherry	PAS1112	PAO1 avec la séquence promotrice de <i>foxA</i> suivie de <i>mCherry</i> insérée dans le génome	Ce travail
prom <i>fptA</i> -YPet	PAS1114	PAO1 avec la séquence promotrice de <i>fptA</i> suivie de <i>YPet</i> insérée dans le génome	Ce travail
prom <i>fpvA</i> -YPet	PAS1115	PAO1 avec la séquence promotrice de <i>fpvA</i> suivie de <i>YPet</i> insérée dans le génome	Ce travail
<i>E. coli</i>			
TOP10		F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1</i> λ	Invitrogen
Plasmides			
pTH1	551	pEXG2 portant la séquence du promoteur de <i>pfeA</i> suivie de la séquence de <i>mCherry</i>	Ce travail
pTH2	552	pEXG2 portant la séquence du promoteur de <i>foxA</i> suivie de la séquence de <i>mCherry</i>	Ce travail
pTH4	554	pEXG2 portant la séquence du promoteur de <i>fptA</i> suivie de la séquence de <i>YPet</i>	Ce travail
pTH5	555	pEXG2 portant la séquence du promoteur de <i>fpvA</i> suivie de la séquence de <i>YPet</i>	Ce travail

Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés dans ce travail.

Oligonucléotides	Séquences (5' à 3')	Utilisation
<i>ppfeA</i> F	CGTAACTAGTCCTCCCCTACCAGCGCCT	Construction plasmide pTH1
<i>ppfeA</i> R	TTCTAGACATCGGTGATCTCCGGGCAATG	Construction plasmide pTH1
pEXG2 <i>ppfeA</i> F	GAGATCACCGATGTCTAGAAGCAAGGGC	Construction plasmide pTH1
pEXG2 <i>ppfeA</i> R	GTAGGGGAGGACTAGTTACGTGGCCTGTAG	Construction plasmide pTH1
<i>pfoxA</i> F	CGTAACTAGTCGGGGTCTATCGCCTGGAC	Construction plasmide pTH2
<i>pfoxA</i> R	TTCTAGACATGAACGGGATCCGTTGGAG	Construction plasmide pTH2
pEXG2 <i>pfoxA</i> F	GATCCCGTTCATGTCTAGAAGCAAGGGC	Construction plasmide pTH2
pEXG2 <i>pfoxA</i> R	ATAGACCCCGACTAGTTACGTGGCCTGTAG	Construction plasmide pTH2
<i>pfptA</i> F	CGTAACTAGTCCGGCGCTGGCGCGTCAGG	Construction plasmide pTH4
<i>pfptA</i> R	CTTTGCTCATCGTTTGAACAGCCTCGGGGGATATAC	Construction plasmide pTH4
pEXG2 <i>pfptA</i> F	TGTTCGAACGATGAGCAAAGGCGAAGAAC	Construction plasmide pTH4
pEXG2 <i>pfptA</i> R	CCAGCGCCGACTAGTTACGTGGCCTGTAG	Construction plasmide pTH4
<i>pfpvA</i> F	CGTAACTAGTGGTCTTCTACACCGAACTGT	Construction plasmide pTH5
<i>pfpvA</i> R	CTTTGCTCATGGGTGATTGCTCTTCTTAGG	Construction plasmide pTH5
pEXG2 <i>pfpvA</i> F	GCAATCACCCATGAGCAAAGGCGAAGAAC	Construction plasmide pTH5
pEXG2 <i>pfpvA</i> R	GTAGAAGACCACTAGTTACGTGGCCTGTAG	Construction plasmide pTH5
<i>clpX</i> F	CTGCGCTCATGCAGATCCT	RT-qPCR
<i>clpX</i> R	TCGAACAGCTTGGCGTACTG	RT-qPCR
<i>proC</i> F	GGCGTATTTCTCCTGCTGA	RT-qPCR
<i>proC</i> R	TGGCCTGGAAGGATTTGAT	RT-qPCR
<i>rpoD</i> F	ACAAGATCCGCAAGGTAAGTGAAG	RT-qPCR
<i>rpoD</i> R	CGCCCAGGTGCGAATC	RT-qPCR
<i>rpsL</i> F	TACACCACCACGCCGAAAA	RT-qPCR
<i>rpsL</i> R	CACCACCGATGTACGAGGAA	RT-qPCR
<i>uvrD</i> F	CTACGGTAGCGAGACCTACAACAA	RT-qPCR
<i>uvrD</i> R	GCGGCTGACGGTATTGGA	RT-qPCR
<i>mCherry</i> F	CAACGTCAACATCAAGTTGGACAT	RT-qPCR
<i>mCherry</i> R	CGTACTGTTCCACGATGGTGTAG	RT-qPCR
<i>pfeA</i> F	GCCGAGACCAGCGTGAAC	RT-qPCR
<i>pfeA</i> R	GGCCGGATTCGATCTTGTT	RT-qPCR
<i>foxA</i> F	AAGGGCTCGGATACCCAGTT	RT-qPCR
<i>foxA</i> R	CGTTGGGATCGTGTTGCA	RT-qPCR
<i>fptA</i> F	GCGCCTGGGCTACAAGATC	RT-qPCR
<i>fptA</i> R	CCGTAGCGGTTGTTCCAGTT	RT-qPCR
<i>fpvA</i> F	AGCCGCCTACCAGGATAAGC	RT-qPCR
<i>fpvA</i> R	TGCCGTAATAGACGCTGGTTT	RT-qPCR
<i>YPet</i> F	ATATCCTGGGCCACAACTG	RT-qPCR
<i>YPet</i> R	CATCACCAATCGGGGTATTC	RT-qPCR

Adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* à l'acquisition du fer : modélisation mathématique des switchs phénotypiques

Résumé

Le fer est un nutriment essentiel à la croissance bactérienne et les bactéries produisent de petites molécules appelées sidérophores pour l'acquérir. *Pseudomonas aeruginosa* peut exprimer au moins 15 voies d'acquisition du fer impliquant deux sidérophores endogènes et de nombreux sidérophores exogènes produits par d'autres bactéries. Toutes ces voies, sauf une, impliquent un transporteur TonB-dépendant (TBDT) pour importer le fer à travers la membrane externe. Des rapporteurs fluorescents ont été développés pour suivre l'expression des TBDT impliqués dans ces voies. Ces rapporteurs ont été validés puis utilisés pour étudier l'expression des TBDT de voies endogènes et exogènes d'acquisition du fer en présence de gradients de concentrations de sidérophores seuls, en mélange ou présents dans des surnageants de cultures bactériennes. Les données obtenues ont permis de construire des modèles mathématiques pour caractériser les schémas d'expression de ces transporteurs.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, Homéostasie du fer, Sidérophore, Transporteur TonB-dépendant, Modélisation mathématique

Abstract

Iron is an essential nutrient for bacterial growth. In order to access this nutrient, bacteria produce siderophores, which are small molecules with a high affinity for iron. *Pseudomonas aeruginosa* can express at least 15 different iron acquisition pathways involving two endogenous siderophores and numerous exogenous siderophores produced by other bacteria. All but one of these pathways involve a TonB-dependent transporter (TBDT) to import iron across the outer membrane. Fluorescent reporters have been developed to monitor the expression of TBDTs involved in these pathways. These reporters were validated and used to study the expression of TBDTs from endogenous and exogenous iron acquisition pathways in the presence of concentration gradients of one siderophore, mixtures of siderophores, or siderophores in bacterial culture supernatants. The data obtained allowed the construction of mathematical models to characterize the expression patterns of these transporters.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Iron homeostasis, Siderophore, TonB-dependent transporter, Mathematical modelling