

*École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé*

UMR 7242 - BSC

**THÈSE** présentée par

**Virginie WILL**

soutenue le : 17 juin 2025

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

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Microbiologie

**Acquisition du fer par les xénosidérophores chez  
*Pseudomonas aeruginosa* : adaptation à  
l'environnement bactérien**

**THÈSE dirigée par :**

**Dr. Isabelle SCHALK**

Directrice de Recherche, Université de Strasbourg - CNRS

**RAPPORTEURS :**

**Dr. Romé VOULHOX**

Directeur de Recherche, Aix-Marseille Université - CNRS

**Dr. Françoise JACOB-DUBUISSON**

Directrice de Recherche, Institut Pasteur de Lille - CNRS

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Pr. Julien GODET**

Professeur, Université de Strasbourg

**Dr. Nathalie DAUTIN**

Chargée de Recherche, Université Paris Cité - CNRS

**Dr. Laurent OUERDANE**

Maître de Conférences, Université de Pau





## Avertissement au lecteur

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition des membres de la communauté universitaire. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Cela implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction ou représentation illicite encourt une poursuite pénale.

This document is the result of a long process approved by the jury and made available to members of the university community. It is subject to the intellectual property rights of its author. This implies an obligation to quote and reference when using this document. Furthermore, any infringement, plagiarism, unlawful reproduction or representation will be prosecuted.

### [Code de la Propriété Intellectuelle](#)

#### [Article L122-4 :](#)

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite. Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction par un art ou un procédé quelconque.

Any representation or reproduction in whole or in part without the consent of the author or his successors in title or assigns is unlawful. The same applies to translation, adaptation or transformation, arrangement or reproduction by any art or process whatsoever.

[Articles L335-1 à L335-9.](#) : Dispositions pénales

## Licence attribuée par l'auteur





# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury de soutenance, Dr. Romé Voulhoux, Dr. Françoise Jacob-Dubuisson, Pr. Julien Godet, Dr. Nathalie Dautin et Dr. Laurent Ouerdane d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je vous remercie également pour le temps consacré à la lecture et à l'évaluation de ce manuscrit et j'espère que ce sujet vous animera autant qu'il m'a animé au cours de ces quatre années de thèse.

Je tiens également à remercier Isabelle pour sa confiance accordée dès mes débuts dans l'équipe. Merci de m'avoir permis de travailler sur un projet qui me correspondait parfaitement et dans lequel je me suis épanouie et pleinement investie au cours de ces quatre dernières années. Merci pour ton écoute, tes conseils, tes retours mais également tout le temps consacré à mon projet. Cela a été un réel plaisir de travailler avec toi.

Merci à Gaëtan pour l'accueil dont il a fait preuve à mon arrivée dans l'équipe mais aussi dans le monde de la chimie. Merci pour tes conseils, ta pédagogie et le temps consacré à répondre à mes nombreuses interrogations de chimie, même si celles-ci étaient parfois naïves, je n'en reste pas moins une biologiste ! Grâce à toi, j'ai redécouvert cette discipline et j'ai surtout appris à la dompter et à l'apprécier.

Je remercie également la Fondation pour la Recherche Médicale pour son soutien, à travers le financement de ma quatrième année de thèse. Ce financement m'a permis de mener à bien l'ensemble des travaux portant sur *P. aeruginosa* en biofilm. Sans cet appui, ce projet n'en serait resté qu'à ses prémices.

Je tiens à remercier la Plateforme de Protéomique de l'IBMC : Lauriane, Philippe et Johana pour vos connaissances, votre disponibilité et votre enthousiasme tout au long de mes différents projets. Un grand merci également au plateau technique d'imagerie de l'IBMC : Jean-Daniel et Romain pour votre disponibilité et votre aide précieuse dans l'analyse de mes données de microscopie.

Un immense merci à Emmanuel pour tout le temps consacré à l'élaboration du projet biofilm, pour son expertise en microscopie confocale et son enthousiasme communicatif. Merci également de m'avoir ouvert les portes du monde fascinant de la microscopie, que j'ai eu un réel plaisir à découvrir à tes côtés.

Un grand merci aussi à Coraline pour sa confiance au cours de mes trois années de monitorat. Je n'aurais pas pu espérer mieux comme première expérience dans l'enseignement. Merci pour ta pédagogie, tous ces beaux moments de partage autour d'une bière et pour les souvenirs inoubliables de notre passage à Copenhague.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe. Merci à Véronique pour ses précieux conseils, son expertise en biologie moléculaire, mais également pour toutes nos discussions. Un grand merci à Anne pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide face aux problèmes rencontrés avec certaines souches bactériennes. Merci également à Françoise pour ses conseils et son aide lors de mes expériences de chimie. Merci à Olivier pour sa disponibilité, nos échanges autour de mon projet qui m'ont permis de voir les choses d'un nouvel œil. Un grand merci à Valérie, Régine et Pierre, pour leurs connaissances sur le biofilm et leur aide précieuse lors du lancement du projet.

Merci aux anciens collègues : Marion, Thibaut, Hélène, Sarah, Aline, Gwen. Merci pour vos précieux conseils au début de ma thèse, et surtout pour tous les bons moments partagés autour d'un repas ou d'une bière. Merci à la « team du midi » actuelle : Florian, Manon, Chris, Walid, Johan, Anne-Eloise, Inès, Victor et Igor, merci pour les fous rires et les parties de Uno qui m'ont permis de lâcher prise entre deux expériences. Une mention spéciale à Florian pour nos discussions interminables sur nos expériences de gradients de concentration au bureau, et à Walid et Johan pour tous ces moments passés sous le PSM, à espérer que nos souches poussent (ou non !) mais surtout à espérer que nos composés se solubilisent ! Merci à Pauline pour le soutien lors des dernières expériences de biofilm et nos discussions pendant ces interminables expériences au cours du week-end.

Un immense merci à Coralie, Victoria, Julia, Margaux et Michel. Merci pour ces merveilleux moments passés ensemble et à venir. Merci pour votre soutien au cours de la rédaction de ce manuscrit et merci d'être présents à chaque étape importante de nos vies depuis maintenant plus

de 10 ans. Merci aussi à ceux qui m'accompagnent depuis mes débuts en biologie : Marion, Théo, Valentin, Perrine, Anthony et Thomas. Merci d'être présents chaque jour, merci pour tous les merveilleux moments passés ensemble. J'ai beaucoup de chance de pouvoir vous compter parmi mes amis.

Un grand merci à mes parents Nathalie et Pascal pour leur soutien indéfectible depuis toutes ces années. Merci de m'avoir toujours encouragée à poursuivre mes rêves, je vous en suis profondément reconnaissante. Un remerciement tout particulier à Edith, pour avoir relu ce manuscrit avec attention. Merci à toi, ainsi qu'à René, de m'avoir aidée à cultiver un regard critique sur le monde qui m'entoure et pour toutes les magnifiques découvertes artistiques réalisées à vos côtés.

Un remerciement tout particulier à Lana, qui m'a accompagné à sa manière, par son regard apaisant et ses ronronnements, tout au long de la rédaction du manuscrit et qui m'a permis de voir cette étape comme une expérience profondément enrichissante, tant sur le plan personnel qu'intellectuel. J'ai également une pensée pour mes grands-parents et à tous les précieux moments partagés. J'aurais tant aimé qu'ils soient là et qu'ils puissent voir l'aboutissement de mon parcours.

Enfin merci à toi Louis, pour ton soutien inconditionnel depuis près de 8 ans. Merci pour le temps consacré à relire cette thèse qui n'en finissait pas, pour les merveilleux moments partagés qui m'ont permis de m'évader, même brièvement, de l'écriture du manuscrit. Merci d'avoir toujours su trouver les mots pour me remotiver dans les moments de doute, et du soutien indéfectible dont tu as fait preuve au cours de la rédaction de ce manuscrit.



# Table des matières

Liste des figures.....	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction.....	15
<b>PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre I : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>19</b>
1 Généralités.....	21
2 <i>P. aeruginosa</i> , un pathogène opportuniste de l'Homme.....	23
3 <i>P. aeruginosa</i> , un pathogène antibiorésistant.....	24
4 <i>P. aeruginosa</i> en biofilm.....	27
4.1 Étapes de formation du biofilm chez <i>P. aeruginosa</i> .....	27
4.2 Composition de la matrice extracellulaire chez <i>P. aeruginosa</i> .....	30
4.3 Facteurs impliqués dans la transition vers le mode de vie sessile.....	32
<b>Chapitre II : Le fer.....</b>	<b>33</b>
1 L'importance du fer en biologie.....	35
2 Contraintes du fer en biologie.....	36
<b>Chapitre III : Homéostasie du fer chez les bactéries à Gram négatif..</b>	<b>39</b>
1 Import du fer ferrique par les bactéries.....	41
1.1 Les sidérophores ou porteurs de fer.....	41
1.2 L'import au travers de la membrane externe, les transporteurs TonB-dépendants (TBDT).....	44

1.2.1	Structure et rôle des TBDTs .....	44
1.2.2	Sélectivité de transport des TBDTs.....	46
1.2.3	Machinerie TonB et transport du ferri-sidérophore à travers la membrane externe	47
1.3	Devenir des complexes ferri-sidérophores après passage au travers de la membrane externe .....	50
1.4	Import du fer ferrique lié à la transferrine et à la lactoferrine .....	51
2	Import du fer ferreux .....	52
3	Import de l'hème.....	54
4	Régulation de l'acquisition du fer .....	57
4.1	Régulateurs globaux de carence en fer .....	57
4.1.1	Le régulateur transcriptionnel Fur .....	57
4.1.2	Les régulateurs post-transcriptionnels, les sRNA .....	59
4.1.3	Le quorum sensing (QS).....	60
4.1.1	Autres régulateurs impliqués dans l'homéostasie du fer.....	62
4.1.1.1	Le système Gac/ Rsm .....	62
4.1.1.2	AmpR.....	62
4.2	Régulateurs spécifiques des voies d'import du fer.....	63
4.2.1	Les ECF-sigma .....	63
4.2.2	Le système à deux composants (TCS) .....	65
4.2.3	Les régulateurs de la famille des AraC.....	66
4.2.4	Les régulateurs de type IcIR .....	68
<b>Chapitre IV : Acquisition du fer chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>		<b>69</b>
1	Les transporteurs TonB-dépendants chez <i>P. aeruginosa</i> .....	71
2	Les voies d'import du fer chez <i>P. aeruginosa</i> .....	71
2.1	Voies d'import du fer par les endosidérophores.....	73
2.1.1	La voie pyoverdine (PVD) .....	73
2.1.1.1	Biosynthèse et sécrétion de la PVD.....	73
2.1.1.2	Import du fer par la PVD.....	76



2.1.1.3	Régulation de l'expression de la voie PVD .....	79
2.1.2	La voie d'import du fer par la pyochéline (PCH) .....	79
2.1.2.1	Biosynthèse et sécrétion de la PCH .....	79
2.1.2.2	Import du fer et régulation de l'expression de la voie PCH.....	81
<b>2.2</b>	<b>Voies d'import du fer par les xénosidérophores .....</b>	<b>83</b>
2.2.1	Import du fer par les sidérophores de type catéchol.....	83
2.2.1.1	Les sidérophores bi- et tricatécholés.....	83
2.2.1.2	Les monocatéchols .....	87
2.2.1.3	La vibriobactine.....	88
2.2.2	Import du fer par les sidérophores de type hydroxamate.....	90
2.2.2.1	Desferrioxamines .....	90
2.2.2.2	Ferrichromes.....	93
2.2.3	Import du fer par les sidérophores de type mixte .....	95
2.2.3.1	Les mycobactines et carboxymycobactines .....	95
2.2.3.2	Sidérophores de type hydroxycarboxylate/hydroxamate.....	97
<b>2.3</b>	<b>Autres voies d'import du fer chez <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>98</b>
2.3.1	Voie d'import du fer par le citrate .....	98
2.3.2	Voies d'import de l'hème .....	99
2.3.3	Voie du Pseudomonas quinolone signal (PQS).....	101
2.3.4	Voie du fer ferreux.....	103
<b>2.4</b>	<b>Import d'autres métaux biologiques chez <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>104</b>
2.4.1	Import du zinc .....	104
2.4.2	Import du cobalt et du cuivre .....	105
<b>3</b>	<b>L'importance du fer lors de la croissance de <i>P. aeruginosa</i> en biofilm.....</b>	<b>106</b>
<b>Chapitre V : Le fer dans les communautés microbiennes .....</b>		
<b>1</b>	<b>Généralités.....</b>	<b>111</b>
<b>2</b>	<b>Interactions compétitives entre <i>P. aeruginosa</i> et les espèces microbiennes de l'environnement .....</b>	<b>112</b>
<b>3</b>	<b>Cas de coopération pour l'accès au fer impliquant <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>113</b>
<b>4</b>	<b>La lutte pour le fer, un enjeu central dans les infections humaines .....</b>	<b>114</b>

4.1	Immunité nutritionnelle .....	114
4.2	Acquisition du fer de l'hôte par les pathogènes .....	116
4.3	Molécules anti-sidérophores.....	116
4.4	Persistance des infections à <i>P. aeruginosa</i> chez l'Homme.....	118
<b>Chapitre VI : Problématique du projet de thèse.....</b>		<b>121</b>
<b>PARTIE II : RÉSULTATS .....</b>		<b>125</b>
<b>Chapitre I : Utilisation des xénosidérophores et des chélateurs</b>		
<b>synthétiques par <i>P. aeruginosa</i> .....</b>		<b>127</b>
1	Xénosidérophores de type hydroxamate .....	129
1.1	Article N°1: The role of FoxA, FiuA, and FpvB in iron acquisition <i>via</i> hydroxamate-type siderophores in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	129
1.2	Dérivés synthétiques de la NOCA.....	157
1.2.1	Introduction du projet .....	157
1.2.2	Résultats.....	158
2	Xénosidérophores de type hydroxycarboxylate.....	166
2.1	Article N°2: Siderophore specificities of the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TonB-dependent transporters ChtA and ActA.....	166
<b>Chapitre II : Utilisation des produits de dégradation de la PCH comme</b>		
<b>sidérophores par <i>P. aeruginosa</i>.....</b>		<b>189</b>
Article N°3: Structure of the outer membrane transporter FemA and its role in the uptake of ferric dihydro-aeruginoic acid and ferric aeruginoic acid in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....		191
<b>Chapitre III : Est-ce que <i>P. aeruginosa</i> utilise des xénosidérophores</b>		
<b>pour acquérir le fer en culture en biofilm ? .....</b>		<b>251</b>
1	Introduction.....	253

2	Résultats .....	253
2.1	Développement d'un protocole permettant l'étude de l'expression des voies d'import du fer en biofilm chez <i>P. aeruginosa</i> .....	253
2.1.1	Description des constructions et des rapporteurs fluorescents utilisés.....	253
2.1.2	Conditions expérimentales testées .....	255
2.1.3	Validation du protocole expérimental par microscopie confocale .....	257
2.1.4	Dosage de la production de PVD et de PCH .....	262
2.1.5	Description de la structure du biofilm formée dans nos conditions de culture	264
2.2	Expression des voies d'import du fer dans les biofilms de <i>P. aeruginosa</i> en présence de xénosidérophores .....	265
2.2.1	Ajout des xénosidérophores en début de culture .....	265
2.2.2	Ajout différé des xénosidérophores sur un biofilm préformé.....	269

## **PARTIE III : DISCUSSION GÉNÉRALE & CONCLUSION .....279**

1	Acquisition du fer <i>via</i> les xénosidérophores et les chélateurs synthétiques en condition de culture planctonique .....	281
2	Utilisation des sidérophores par <i>P. aeruginosa</i> en biofilm.....	290
3	Les xénosidérophores au sein des communautés microbiennes .....	293
4	Conclusion.....	295

## **PARTIE IV : MATÉRIEL & MÉTHODES.....297**

1	Produits, souches et conditions de culture .....	299
1.1	Réactifs chimiques .....	299
1.2	Construction des mutants de <i>P. aeruginosa</i> .....	299
1.2.1	Construction du vecteur suicide intégrant la modification génique .....	299
1.2.2	Conjugaison triparentale et sélection de clones recombinants .....	300
1.3	Milieux et conditions de culture .....	300
2	Suivi de croissance bactérienne en culture planctonique .....	301

3	Transport de $^{55}\text{Fe}$ chez <i>P. aeruginosa</i> .....	301
4	Suivi de l'expression des TBDTs au sein du biofilm .....	302
5	Analyse transcriptomique et protéomique chez <i>P. aeruginosa</i> .....	303
5.1	Préparation des échantillons.....	303
5.2	Analyse protéomique différentielle.....	303
5.3	PCR quantitative en temps réel.....	304
6	Caractérisation des sidérophores .....	305
6.1	Quantification de la pyoverdine (PVD) .....	305
6.2	Quantification de la pyochéline (PCH) .....	306
6.3	Profilage métabolique par spectrométrie de masse.....	306
	<b>Bibliographie</b> .....	<b>307</b>

# Liste des figures

Figure 1 : Aspects morphologiques de la souche <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	21
Figure 2 : Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques.....	25
Figure 3 : Comparaison des listes d'agents pathogènes bactériens prioritaires .....	26
Figure 4 : Modèle de formation du biofilm .....	29
Figure 5 : Structure des sidérophores et de leurs fonctions chélatrices .....	42
Figure 6 : Structure aux rayons X du TBDT FpvA de <i>P. aeruginosa</i> (PDB 205P).....	45
Figure 7 : Structure aux rayons X de PfeA-ferri-ENT de <i>P. aeruginosa</i> (PDB 6Q5E) .....	47
Figure 8 : Fonctionnement de la machinerie TonB-ExbBD .....	49
Figure 9 : Devenir du fer dans la cellule .....	50
Figure 10 : Acquisition du fer ferrique par la transferrine chez les <i>Neisseriaceae</i> , <i>Pasteurellaceae</i> et <i>Moraxellaceae</i> .....	52
Figure 11 : Systèmes d'acquisition du fer ferreux retrouvés chez les bactéries à Gram négatif.....	54
Figure 12 : Systèmes d'import de l'hème chez les bactéries à Gram négatif.....	55
Figure 13 : Mécanisme de régulation médié par Fur chez <i>P. aeruginosa</i> .....	58
Figure 14 : Organisation du locus <i>prfF</i> chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	59
Figure 15 : Réseau croisé du quorum sensing (QS) chez <i>P. aeruginosa</i> .....	61
Figure 16 : Fonctionnement du système sigma/anti-sigma .....	64
Figure 17 : Fonctionnement du système à deux composants .....	66
Figure 18 : Fonctionnement du système AraCpBAD chez <i>E. coli</i> .....	67
Figure 19 : Structure chimique de la PVDI produite par <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	73

Figure 20 : Voie de biosynthèse de la PVD chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	75
Figure 21 : Structure cristallographie de FpvA-ferri-PVD (PDB 2IAH).....	77
Figure 22 : Représentation schématique de la voie de la PVD chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	78
Figure 23 : Voie de biosynthèse de la pyochéline (PCH) chez <i>P. aeruginosa</i> .....	80
Figure 24 : Structure cristallographique de FptA lié au complexe ferri-PCH.....	81
Figure 25 : Représentation schématique de la voie de la PCH chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	82
Figure 26 : Structure chimique de l'entérobactine .....	83
Figure 27 : Structure aux rayons X de PfeA liant le complexe ferri-ENT .....	84
Figure 28 : Voie d'acquisition du fer par l'ENT chez <i>P. aeruginosa</i> .....	85
Figure 29 : Structure chimique des tricatéchols salmochéline, protochéline et du biscatéchol azotochéline .....	86
Figure 30 : Structure des monocatéchols utilisés comme xénosidérophores par <i>P. aeruginosa</i> pour capter le fer .....	87
Figure 31 : Voie d'acquisition du fer par les monocatéchols chez <i>P. aeruginosa</i> .....	88
Figure 32 : Structure chimique de la vibriobactine produite par <i>Vibrio cholerae</i> .....	89
Figure 33 : Voie d'acquisition du fer de la vibriobactine (VIB) chez <i>P. aeruginosa</i> .....	90
Figure 34 : Structure chimique de la desferrioxamine B et de la nocardamine .....	91
Figure 35 : Structure aux rayons X de FoxA lié au complexe ferri-NOCA .....	92
Figure 36 : Structure de la bisucabérine.....	93
Figure 37 : Structure chimique des sidérophores de la famille des ferrichromes.....	94
Figure 38 : Voie d'acquisition du fer par les sidérophores de type hydroxamate chez <i>P. aeruginosa</i> .....	95
Figure 39 : Structure générale de la mycobactine et de la carboxymycobactine .....	96

Figure 40 : Voie d'import du fer par les mycobactines (MYCO, CarbMYCO) chez <i>P. aeruginosa</i> .....	97
Figure 41 : Structure chimique des sidérophores mixtes citrates/hydroxamates.....	98
Figure 42 : Voie d'import du fer par le citrate chez <i>P. aeruginosa</i> .....	99
Figure 43 : Structure de l'hème B .....	100
Figure 44 : Voies d'acquisition de l'hème chez <i>P. aeruginosa</i> .....	101
Figure 45 : Voie d'acquisition du ferri-PQS chez <i>P. aeruginosa</i> .....	102
Figure 46 : Voie d'acquisition du fer ferreux chez <i>P. aeruginosa</i> .....	103
Figure 47 : Voie d'acquisition du Zn par la pseudopaline chez <i>P. aeruginosa</i> .....	105
Figure 48 : Le rôle du fer dans les premières étapes de formation du biofilm chez <i>P. aeruginosa</i> ....	107
Figure 49 : Exemple d'interactions compétitives pour l'accès au fer entre les différentes espèces de la communauté microbienne.....	113
Figure 50 : Structures des protéines de liaison au fer chez l'hôte .....	115
Figure 51 : Structure de la sidéocaline .....	117
Figure 52 : Structure chimique de l'entérobactine et de son dérivé glycosylé, la salmochéline S4....	118
Figure 53 : Schéma représentatif de l'évolution de l'acquisition du fer chez <i>P. aeruginosa</i> en réponse aux modifications environnementales.....	119
Figure 54 : Schéma général des différents axes de recherche étudiés au cours de ma thèse.....	124
Figure 55 : Structure chimique de la desferrioxamine E (DFOE) et de ses analogues structuraux cycliques .....	158
Figure 56 : Acquisition du fer par <i>P. aeruginosa</i> $\Delta pvdF\Delta pchA$ en présence des analogues de DFOE .....	159
Figure 57 : Acquisition du $^{55}\text{Fe}$ chez <i>P. aeruginosa</i> $\Delta pvdF\Delta pchA$ et délétée de <i>foxA</i> en présence des analogues de la DFOE .....	161

Figure 58 : Suivi de la croissance bactérienne en condition de carence en fer .....	163
Figure 59 : Modulation de la transcription des gènes codant pour des TBDTs impliqués dans l'acquisition du fer chez les cellules de <i>P. aeruginosa</i> .....	164
Figure 60 : Rapporteurs fluorescents et marqueurs utilisés dans l'étude de l'expression des voies d'import du fer dans les biofilms de <i>P. aeruginosa</i> .....	255
Figure 61 : Visualisation par microscopie confocale de l'expression des marqueurs fluorescents DAPI, mCherry et Ypet au sein du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> ( <i>P<sub>fp1A</sub>-ypet</i> ) après 2, 4 et 6 jours de culture .....	260
Figure 62 : Visualisation par microscopie confocale de l'expression des marqueurs fluorescents DAPI, mCherry et Ypet et de la superposition de l'ensemble des signaux (merged) au sein du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> après 2, 4 et 6 jours de culture .....	262
Figure 63 : Quantification de la production des sidérophores endogènes dans le surnageant de <i>P. aeruginosa</i> en biofilm après 2, 4 et 6 jours de culture.....	263
Figure 64 : Visualisation par microscopie confocale de la fluorescence de Ypet au sein du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> après 2, 4 et 6 jours de culture .....	269
Figure 65 : Voie d'acquisition du fer par les sidérophores de type hydroxamate chez <i>P. aeruginosa</i> .....	283
Figure 66 : Voie d'acquisition des sidérophores de type hydroxycarboxylate (RHIZOF, STAPH A) et des sidérophores mixtes hydroxycarboxylate/hydroxamate (AERO, ARTHRO, RHIZO, SCHIZO) chez <i>P. aeruginosa</i> .....	285
Figure 67 : Voie d'acquisition du fer de la PCH et de ses produits de dégradation (AA, DHA) chez <i>P. aeruginosa</i> .....	287
Figure 68 : Modèle proposé de formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> dans nos conditions expérimentales en réponse à la présence de xénosidérophores.....	292



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Types d'infections à <i>P. aeruginosa</i> retrouvés chez l'Homme.....	23
Tableau 2 : Facteurs de virulence clés dans la formation et le développement du biofilm chez <i>P. aeruginosa</i> .....	31
Tableau 3 : Tableau général de l'affinité des sidérophores pour les ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ).....	43
Tableau 4 : Liste des facteurs extracytoplasmiques (ECF) sigma et anti-sigma chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et leur transporteur TonB-dépendant (TBDT) cible.....	65
Tableau 5 : Liste des TBDTs présents dans le génome de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	72
Tableau 6 : Conditions expérimentales testées pour l'optimisation du protocole de formation du biofilm chez <i>P. aeruginosa</i> .....	256
Tableau 7 : Épaisseur maximale du biofilm formé par <i>P. aeruginosa</i> au cours du temps pour chaque construction fluorescente utilisée .....	264
Tableau 8 : Liste actualisée des TBDTs présents dans le génome de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	288

## Liste des abréviations

AA : Acide aéroïgine  
ABC : ATP-binding cassette  
AERO : Aéroïgine  
AHL : N-acyl-homoserine lactone  
AI : Auto-inducteur  
ARNm : ARN messenger  
ARTHRO : Arthroïgine  
BHL : N-butyryl-L-homoserine lactone  
BPPL : Liste d'agents pathogènes bactériens prioritaires  
Bfr : Bactéroïgine  
CarbMYCO : Carboxymycobactine  
CCCP : Carbonyl cyanide m-chlorophényl hydrazone  
c-di-GMP : Acide cyclique-3-5-diguanylique  
CF : Fibrose kystique (mucoviscidose)  
CHRY : Ferrichrysine  
CLSM : Microscopie confocale à balayage laser  
Co-IP : Co-immunoprécipitation  
CSS : Signalisation de surface cellulaire  
DHA : Acide dihydroaéroïgine  
DHBS : 2,3-dihydroxybenzoïgine  
DFOB : Desferrioxamine B  
DFOE : Desferrioxamine E (Nocardamine)  
DFOG : Desferrioxamine G  
DGC : Diguanylate cyclase  
DMSO : Diméthyl sulfoxyde  
ECF : Fonction extracytoplasmique  
eDNA : ADN extracellulaire  
ENT : Entéroïgine

EPS : Substance polymérique extracellulaire

FC : Fold change

FRC : Ferrichrome

Fur : Ferrous uptake regulator

HTH : Hélice-tour-hélice

L : Ligand

LB : Lysogeny broth

Mbp : Millions de paires de base

MFS : Major facilitator superfamily

MYCO : Mycobactine

NOCA : Nocardamine

NRPS : Peptides synthétases non-ribosomaux

OCS : Système à un composant

OddHL : N(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone

OMS : Organisation Mondiale pour la Santé

OMV : Vésicule de la membrane externe

PCA : Phénazine-1 acide carboxylique

PCH : Pyochéline

PCP : Protéine porteuse de peptide

PCR : Réaction de polymérase en chaîne

PDE : Phosphodiesterase

PET : Tomographie par émission de positons

PFA : Paraformaldéhyde

PME : Pyochéline méthyl ester

PMF : Force proton-motrice

PKs : Polycétides synthases

PQS : Pseudomonas quinolone system

PVD : Pyoverdine

qRT-PCR : Quantitative reverse transcriptase PCR

QS : Quorum sensing

RBS : Site de liaison au ribosome  
RHODO : Acide rhodotorulique  
RHIZO : Rhizobactine  
RHIZOF : Rhizoferrine  
RIP : Protéolyse intermembranaire régulée  
ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
SCHIZO : Schizokinen  
SD : Domaine de signalisation  
sRNA : Petits ARN régulateurs  
STAPH A : Staphyloferrine A  
TAFC : Triacétylfusarinine C  
TBDT : Transporteur TonB-Dépendant  
TCS : Système à deux composants  
TE : Thioestérase  
TEM : Microscopie électronique à transmission  
ToxA : Exotoxine A  
TSS : Système de sécrétion de type  
VIB : Vibriobactine  
WHO : World Health Organization (OMS)  
Zur : Zinc uptake regulator

# Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif et un pathogène opportuniste de l'Homme. Cette bactérie ubiquitaire est retrouvée dans divers environnements tels que l'eau, le sol ou en infection. Responsable de nombreuses maladies humaines, *P. aeruginosa* est particulièrement difficile à éradiquer du fait de sa capacité à former des biofilms et à résister aux antibiotiques.

Comme pour la plupart des microorganismes, le fer est un élément essentiel à la vie et la croissance de *P. aeruginosa* mais est faiblement biodisponible dans la plupart des biotopes. Pour accéder au fer, les bactéries synthétisent et sécrètent des sidérophores, petites molécules avec une forte affinité pour le fer. Les complexes ferri-sidérophores formés dans l'environnement bactérien sont importés efficacement dans la bactérie par des transporteurs spécifiques. Un grand nombre de bactéries utilise également des sidérophores produits par d'autres organismes, appelés « xénosidérophores », dans une stratégie de piratage. C'est le cas de *P. aeruginosa*, qui synthétise et sécrète deux sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline, et qui utilise également des xénosidérophores.

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée à l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa*, et plus particulièrement aux voies d'import utilisant des xénosidérophores, aussi bien en culture planctonique qu'en biofilm.

La première partie du manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique portant sur *P. aeruginosa*, les voies d'import du fer chez cette bactérie et l'importance du fer dans les communautés microbiennes.

La deuxième partie du manuscrit présentera les résultats obtenus au cours de cette thèse sous forme d'articles, suivis par une discussion générale et d'une conclusion. Enfin, une dernière section décrira l'ensemble des méthodes utilisées au cours de cette thèse concernant les expériences scientifiques.



PARTIE I : SYNTHÈSE  
BIBLIOGRAPHIQUE





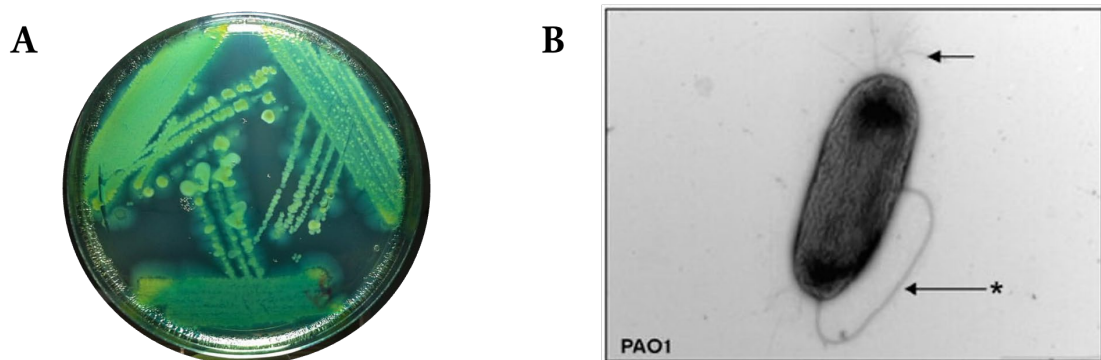
# Chapitre I : *Pseudomonas aeruginosa*



# 1 Généralités

*P. aeruginosa* a été observée pour la première fois en 1872 par Schroeter, qui la décrit comme une bactérie mobile présente dans l'eau et produisant un pus de couleur bleu-vert, en référence au pigment pyocyanine produit par la bactérie (Schroeter, 1872). Il la nomma *Bacterium aeruginosum*. Dix ans plus tard, Carle Gessard, militaire et pharmacien français, l'isola à partir d'une infection d'une plaie d'un soldat, dans son étude intitulée « On the blue and green coloration of bandages » (Gessard, 1882). En 1894, Walter Migula proposa de classer la bactérie dans le genre *Pseudomonas*, regroupant les bacilles à Gram négatif aérobies à flagelle polaire, et la renomma *Pseudomonas aeruginosa* (Migula, 1900). Aujourd'hui, les *Pseudomonas* capables de produire la pyoverdine sont classés parmi les *Pseudomonas* fluorescents.

*Pseudomonas* provient du grec *pseudo-* (faux) et *monas* (unité, en référence à un organisme unicellulaire), et *aeruginosa* provient du latin *aerugo* (vert-de-gris), en lien avec la sécrétion de la pyocyanine (bleu) et de la pyoverdine (vert-jaune fluorescent) par la bactérie (Figure 1A). Cette spécificité lui a également valu l'appellation de bacille pyocyanique, en référence au pigment éponyme.



**Figure 1 :** Aspects morphologiques de la souche *P. aeruginosa* PAO1, modèle d'étude au laboratoire. **A.** Observation macroscopique d'une culture sur boîte de la souche PAO1 en milieu carencé en fer où la bactérie produit un pigment vert appelé pyoverdine. **B.** Observation par microscopie électronique à transmission (TEM). La flèche du haut indique les pili et celle du bas indique le flagelle (Lindhout et al., 2009).

*P. aeruginosa* est un bacille à coloration de Gram négatif, ce qui signifie qu'il possède deux membranes : une interne, appelée cytoplasmique, et une externe, composée de lipopolysaccharides. Ces deux membranes sont séparées par un compartiment périplasmique contenant une fine couche de peptidoglycane. La bactérie mesure 1-3  $\mu\text{m}$  de long pour 0.5 à 1  $\mu\text{m}$  de large et possède des pili ainsi qu'un flagelle polaire (ciliature monotriche) qui lui permet de se mouvoir dans son

environnement (Figure 1B). Son métabolisme respiratoire est de type aérobie, mais la bactérie est également capable de s'adapter à des conditions anoxiques (microaérobie, anaérobie stricte) où le nitrate remplace alors l'O<sub>2</sub> comme acceptateur final d'électrons (Davies et al., 1989).

Au laboratoire, nous travaillons sur la souche modèle *P. aeruginosa* PAO1. Première souche séquencée de l'espèce en 2000, son génome mesure 6,3 millions de paires de base (Mbp) et comprend 5570 cadres de lecture ouverte prédits (Stover et al., 2000). Son génome code 521 gènes impliqués dans des éléments de régulation, 370 gènes impliqués dans la virulence bactérienne, près de 150 gènes codant des protéines de membrane externe et environ 300 gènes codant des protéines de membrane cytoplasmique (Silby et al., 2011). Ces caractéristiques génétiques expliquent pourquoi *P. aeruginosa* est capable de s'adapter aussi facilement à une multitude d'environnements, qu'il s'agisse de milieux hydriques (réseaux d'eau, de canalisation), de sols, de végétaux, d'animaux ou d'environnement hospitalier, et lui permettent de survivre dans une gamme très étendue de température allant de 4 à 42 °C (sa température optimale étant à 37 °C).

*P. aeruginosa* se caractérise également par sa capacité à alterner entre deux formes de vie : une forme mobile et une forme sessile.

La forme mobile, appelée **forme planctonique**, est rendue possible par la présence d'un flagelle polaire. Cette capacité à se mouvoir permet à la bactérie d'accéder facilement aux nutriments nécessaires à sa croissance, favorisant ainsi la colonisation de son environnement et l'accès à de nouvelles niches écologiques (Madigan et al., 2009).

La forme sessile, appelée **biofilm**, se caractérise par l'adhésion de bactéries à une surface et entre elles, permettant la formation d'une structure organisée où les bactéries sont enchâssées dans une matrice extracellulaire. Ce mode de vie permet à la bactérie de contrôler son environnement, tout en la rendant résistante à toute agression externe (antibiotiques, système immunitaire, autres pathogènes) et à toute modification environnementale (pression osmotique, pH, O<sub>2</sub>), garantissant ainsi une colonisation durable dans le temps (O'Toole et al., 2000).

## 2 *P. aeruginosa*, un pathogène opportuniste de l'Homme

Bien que *P. aeruginosa* colonise de nombreux biotopes, cette bactérie est principalement connue pour être un pathogène opportuniste de l'Homme à l'origine d'infections aiguës à chroniques variées. Ces infections touchent principalement des personnes présentant des facteurs de risque tels que l'immunodépression, l'âge avancé, les grands brûlés ou en complément de pathologies préexistantes. Les infections à *P. aeruginosa* sont souvent acquises à l'hôpital (infections nosocomiales) où ce pathogène représentait en 2022 7% de ces infections (Santé Publique France, 2022). Cette prévalence s'explique par sa présence fréquente dans l'environnement proche des patients (contact avec du matériel médical contaminé, eau souillée, manuportage du personnel soignant) entraînant une colonisation transitoire de la flore digestive ou cutanée. Les types d'infections à *P. aeruginosa* retrouvées chez l'Homme sont résumées dans le [Tableau 1](#).

**Tableau 1 :** Types d'infections à *P. aeruginosa* retrouvés chez l'Homme

Type d'infection	Patients à risque
Broncho-pulmonaire	Personnes âgées, patients en réanimation (intubés, ventilés), patients atteints de mucoviscidose
Urinaire	Patients porteurs de sondes urinaires
Cutanée	Grands brûlés, patients alités (escarres), infection post-opératoire
Bactériémie	Patients immunodéficients ou portant des cathéters veineux centraux
Pied diabétique	Patients atteints de diabète
Oculaire ou kératite bactérienne	Port de lentilles de contact contaminées ou solution de lavage contaminée

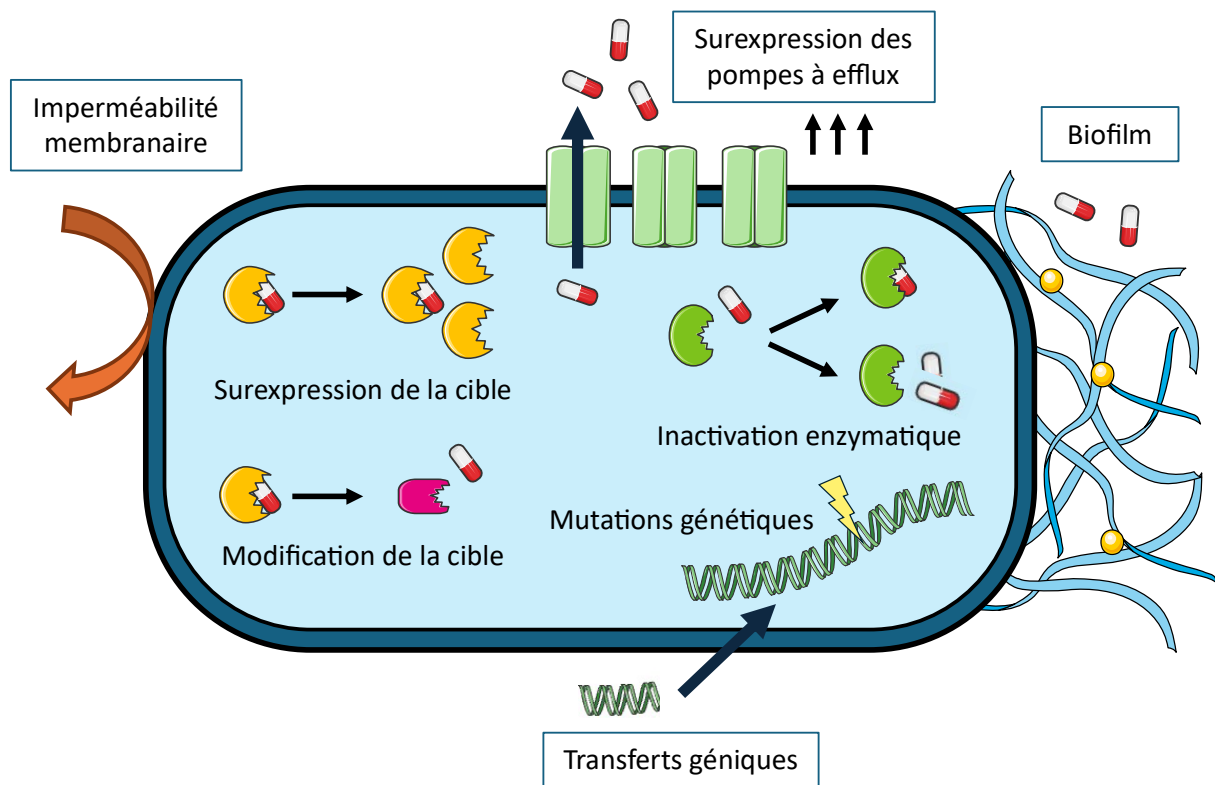
Parmi ces infections, les **infections broncho-pulmonaires** représentent la principale cause d'infection à *P. aeruginosa* chez l'Homme, notamment dans le cadre de pneumonies acquises en soins intensifs (European Centre for Disease Prevention and Control, 2021), et chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Cette maladie génétique autosomale résulte en effet de la production d'un épais mucus obstruant les voies respiratoires et digestives, favorisant l'implantation de pathogènes opportunistes tels que *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* et certaines mycobactéries (Ciofu *et al.*, 2013). La prévalence d'une infection à *P. aeruginosa* augmente avec l'âge des patients, touchant près de 60% des adultes, et s'accompagne généralement d'une augmentation de la mortalité (Cystic fibrosis trust, 2022).

La capacité de *P. aeruginosa* à infecter et coloniser de multiples tissus chez son hôte, notamment au niveau respiratoire, s'explique par ses capacités métaboliques remarquables, qui lui permettent de maintenir une colonisation pérenne de l'hôte sous forme de biofilm. Cette aptitude souligne l'importance d'une prise en charge thérapeutique rigoureuse en milieu médical afin de prévenir l'établissement d'une infection chronique à *P. aeruginosa*.

### 3 *P. aeruginosa*, un pathogène antibiorésistant

La prise en charge des infections à *P. aeruginosa* constitue un défi majeur en raison de sa résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques. *P. aeruginosa* possède divers mécanismes de résistance, comme une faible perméabilité de sa membrane externe, la production d'une bêta-lactamase (AmpC) ou encore la surexpression de pompes à efflux (Barbier and Wolff, 2010). De plus, la présence d'antibiotiques dans l'environnement bactérien favorise sa transition d'un mode de vie planctonique à une forme sessile (biofilm), conduisant à des infections chroniques. La formation d'une matrice extracellulaire limite alors drastiquement la diffusion des antibiotiques, réduisant leur efficacité contre les cellules du biofilm (Figure 2) (Malhotra *et al.*, 2019).

Aussi, sous l'effet de la pression de sélection induite par l'usage prolongé et répété d'antibiotiques, *P. aeruginosa* a également développé des mécanismes de résistance, tels que la modification du site de liaison ou l'inactivation enzymatique. Ces adaptations résultent de mutations génétiques ou de transferts horizontaux de gènes de résistance, compliquant davantage le traitement des infections à *P. aeruginosa* (Figure 2) (Barbier and Wolff, 2010). L'usage excessif et souvent inapproprié des antibiotiques accentue cette pression de sélection, favorisant l'émergence et la persistance de souches multirésistantes (Hirsch and Tam, 2010).



**Figure 2 :** Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. L'antibiorésistance peut provenir d'un événement génétique (mutations avec surexpression ou modification de la cible, transferts horizontaux de gènes), de l'expression de mécanismes de résistance (surexpression des pompes à efflux, inactivation de l'antibiotique par séquestration ou dégradation) ou encore des modifications physiologiques de la bactérie (formation de biofilm, imperméabilité membranaire).

Cette problématique est illustrée par les données épidémiologiques récentes : au cours des dix dernières années, plus de 10 % des souches isolées de patients présentaient une multirésistance aux antibiotiques conventionnellement utilisés pour traiter *P. aeruginosa* (Pottier *et al.*, 2023). Par ailleurs, en 2022, les infections à *P. aeruginosa* représentaient la cinquième cause de mortalité liée à la résistance aux antibiotiques aux Etats-Unis (Aguilar *et al.*, 2023). Dans ce contexte, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié en 2017 une liste de 12 pathogènes prioritaires, désignés par l'acronyme **ESKAPE**, caractérisés par leur résistance accrue aux antibiotiques et nécessitant le développement urgent de nouvelles approches thérapeutiques (World Health Organization, 2017). *P. aeruginosa* y figurait alors comme pathogène de priorité critique, en raison de sa résistance croissante aux carbapénèmes (Figure 3). Lors de la révision de cette classification en 2024, *P. aeruginosa* a toutefois été rétrogradé en priorité élevée (10<sup>ème</sup> position), en lien avec une diminution de sa transmission et une baisse de la résistance observée dans certaines régions du

monde (Figure 3). Néanmoins, les infections à *P. aeruginosa* demeurent préoccupantes dans les pays en développement, ainsi qu'en Asie centrale et en Europe de l'Est (World Health Organization, 2024).

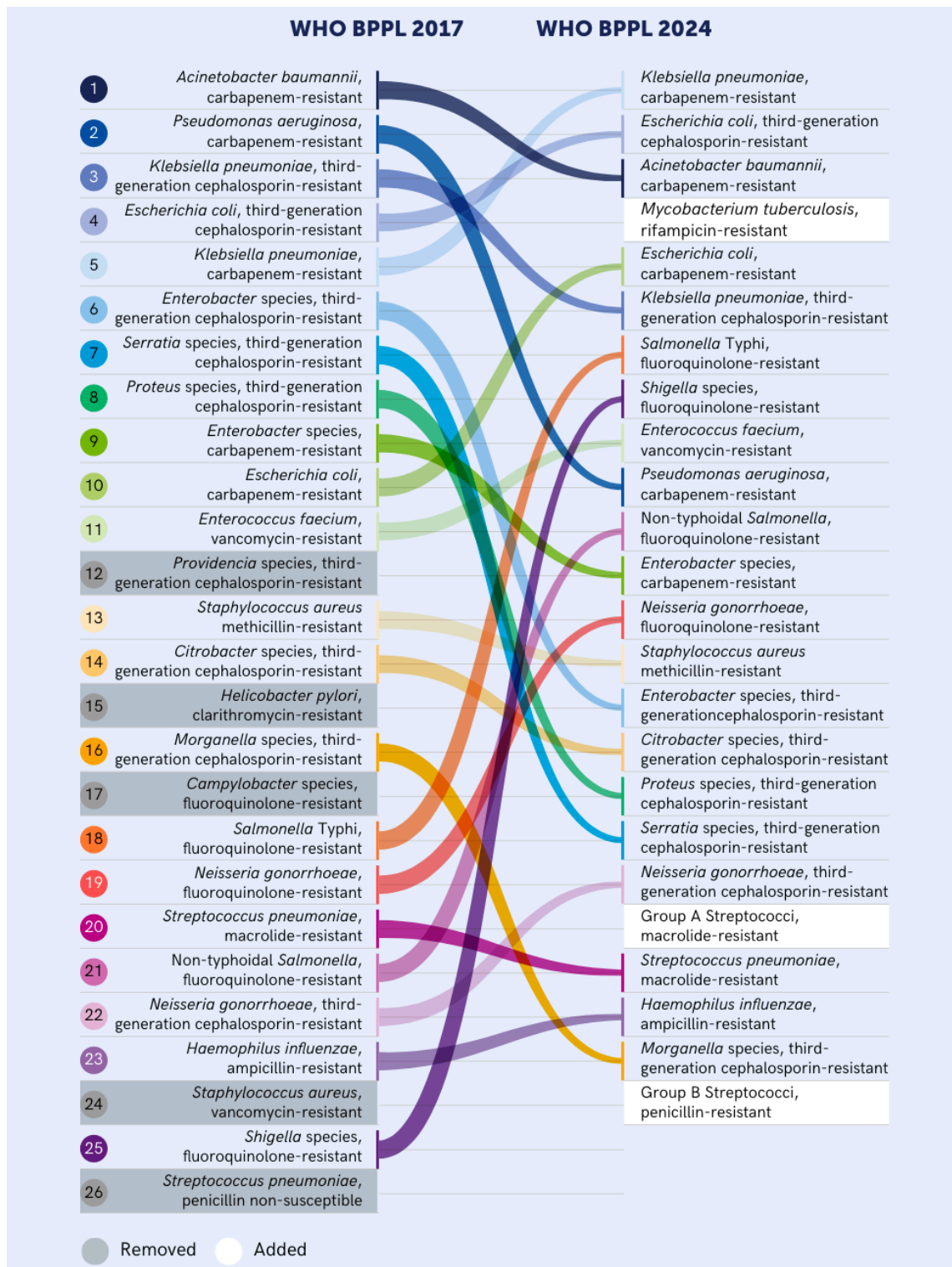


Figure 3 : Comparaison des listes d'agents pathogènes bactériens prioritaires (BPPL) publiées par l'OMS (WHO) en 2017 (colonne de gauche) et mise à jour en 2024 (colonne de droite) (World Health Organization, 2024).



## 4 *P. aeruginosa* en biofilm

Bien que la forme planctonique de *P. aeruginosa* soit la forme la plus étudiée en laboratoire, c'est la forme sessile qui prédomine dans les divers biotopes. La forme sessile se traduit par la formation d'un biofilm, qui est une structure tridimensionnelle de cellules bactériennes fixées et enchâssées dans une matrice extracellulaire appelée substance polymérique extracellulaire (EPS) qu'elles synthétisent. Cette matrice diminue la susceptibilité des bactéries aux variations environnementales, facilitant ainsi leur implantation chez l'hôte. La formation du biofilm est un processus hautement organisé, impliquant une multitude de facteurs qui seront développés dans cette section.

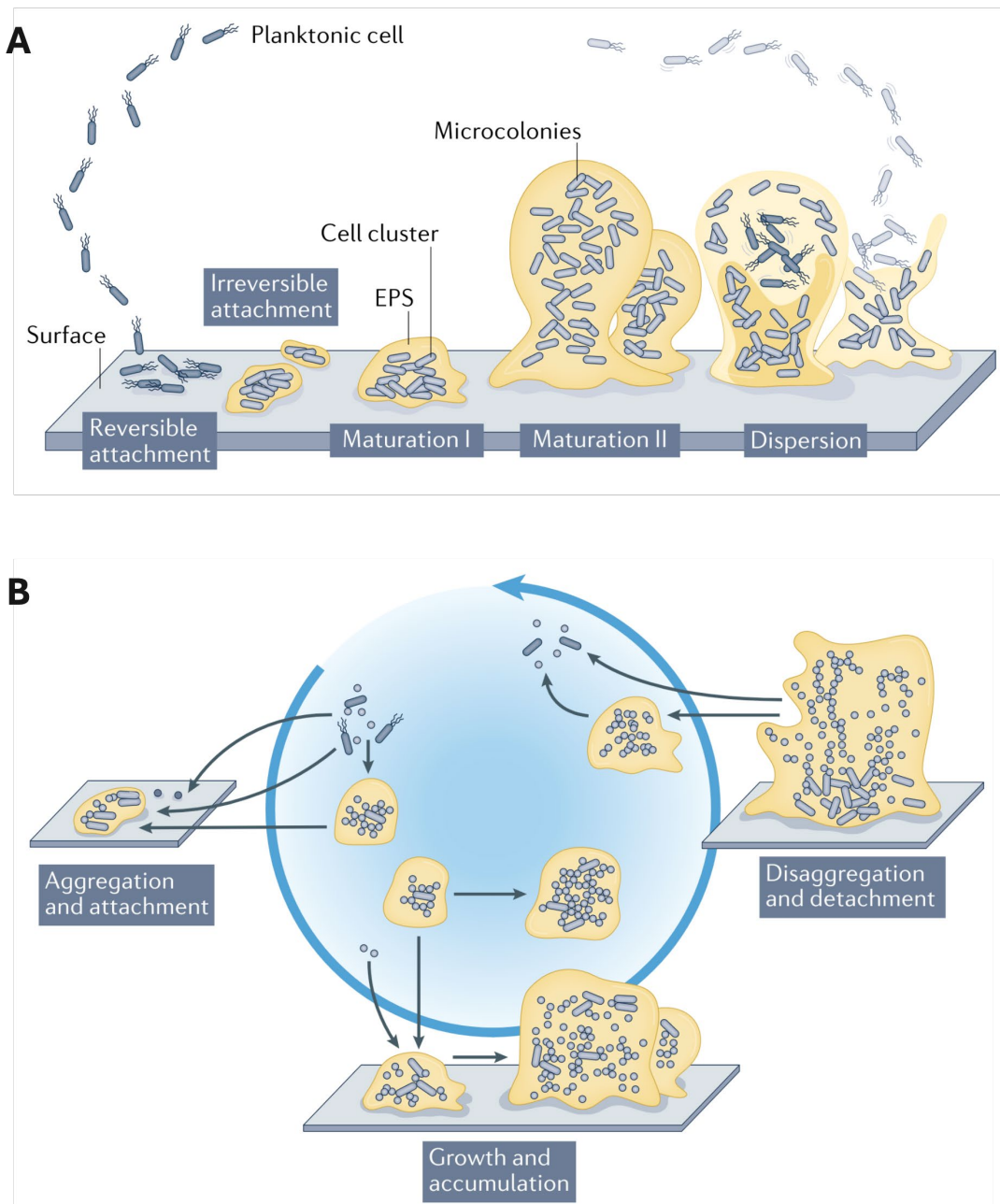
### 4.1 Étapes de formation du biofilm chez *P. aeruginosa*

L'étude de la transition vers une structure sessile organisée, appelée biofilm, a largement été menée sur *P. aeruginosa*, qui est connue pour former facilement un biofilm de structure caractéristique en champignon, faisant de cette bactérie un modèle de référence pour l'étude du biofilm. Les recherches menées sur *P. aeruginosa* ont mis en évidence que, durant la formation du biofilm, la bactérie subit d'importantes modifications physiologiques, qui ont alors été identifiées comme des étapes distinctes du développement du biofilm (Sauer *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 2002). Ces travaux ont conduit à l'élaboration d'un modèle conceptuel décrivant la formation cyclique du biofilm en cinq étapes :

- Étape 1 : *Attachement initial réversible à la surface*. Les bactéries planctoniques mobiles vont percevoir la surface (abiotique ou biotique) et initier leur attachement à l'aide de leur flagelle polaire, qui stabilise l'interaction.
- Étape 2 : *Attachement irréversible à la surface*. Une fois l'interaction initiale stabilisée, une seconde adhésion s'opère le long de l'axe longitudinal de la bactérie, conduisant à son attachement irréversible. Cette adhésion est initiée par les pili de type IV qui vont prolonger le contact initial de la bactérie à la surface, ainsi que la production de fimbriae, d'amyloïdes, de lectines et d'EPS qui stabilisent l'adhésion et permettent la fixation durable à la surface. Cette étape marque la formation d'une monocouche bactérienne produisant une matrice.

- Étape 3 : *Maturation I*. Le biofilm subit une maturation primaire, marquée par le développement d'agrégats formés à partir des cellules sessiles adhérentes. La production d'EPS est également amplifiée, consolidant ainsi la structure du biofilm et rendant les bactéries plus tolérantes aux antibiotiques.
- Étape 4 : *Maturation II*. Les agrégats se développent en des structures tridimensionnelles organisées, appelées microcolonies, qui prennent une forme caractéristique de champignon.
- Étape 5 : *Dispersion*. Une fois le biofilm mature, les cellules sessiles se détachent de la matrice et se dispersent dans l'environnement. Ce processus permet aux bactéries mobiles de coloniser de nouvelles niches et favorise ainsi la propagation de l'infection. La libération de ces cellules implique la dégradation de la matrice par des enzymes telles que des DNases ou des endonucléases (Figure 4A) (Sauer *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 2002).

Toutefois, ce modèle, souvent généralisé pour toutes les espèces bactériennes, ne reflète pas toute la complexité des biofilms *in vivo* et de ces diverses architectures, qui sont dépendantes des conditions environnementales (flux, nutriments). En effet, la structure caractéristique en champignon de *P. aeruginosa* se forme uniquement sous un faible flux constant lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone, tandis que les autres sources de carbone (citrate, benzoate) conduisent à un biofilm plat (Klausen *et al.*, 2003). De plus, les biofilms peuvent se développer sous forme de pellicule (biofilm à l'interface air-liquide) ou d'agrégats (bactéries adhérentes les unes aux autres), n'incluant aucune adhésion à une surface solide. Un nouveau modèle en trois étapes (agrégation, croissance et désagrégation) a donc récemment été proposé par Karin Sauer et ses collaborateurs, permettant de prendre en compte l'hétérogénéité des agrégats et des diverses conditions environnementales (Figure 4B) (Sauer *et al.*, 2022).



**Figure 4 :** Modèle de formation du biofilm. **A.** Modèle historique en cinq étapes : les cellules planctoniques individuelles s'adhèrent réversiblement à la surface à l'aide de leur flagelle, suivi par une adhésion irréversible par adhésion longitudinale de la bactérie et par production de matrice extracellulaire (EPS). La maturation I et II du biofilm conduit à la formation de microcolonies intégrées dans une matrice, qui vont se disperser pour coloniser de nouvelles niches écologiques par dégradation de cette matrice. **B.** Nouveau modèle en trois étapes : agrégation et attachement entre bactéries ou à une surface, suivi de leur croissance et accumulation, puis de leur désagrégation et de leur détachement, au cours desquels les bactéries se dispersent sous forme de cellules uniques. Schéma adapté de (Sauer *et al.*, 2022).

## 4.2 Composition de la matrice extracellulaire chez *P. aeruginosa*

La structure et la composition du biofilm confèrent aux bactéries une tolérance accrue aux variations environnementales (pH, stress osmotique, système immunitaire, antibiotiques). La matrice représente en effet près de 90% du poids sec du biofilm et se compose principalement d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire (eDNA) provenant de la lyse cellulaire, de protéines et de lipides (Flemming and Wingender, 2010). Chez *P. aeruginosa*, les exopolysaccharides Psl, Pel et alginates sont les principaux composants de la matrice extracellulaire et interviennent dans l'adhésion et l'organisation du biofilm où chaque protéine remplit une fonction spécifique au cours des différentes étapes de développement du biofilm (Ghafoor *et al.*, 2011).

Les polysaccharides Pel et Psl vont jouer un rôle essentiel dans l'ancrage des cellules à la surface et dans l'initiation et le maintien des interactions entre les cellules (Colvin *et al.*, 2011). Pel est également le composé majeur de la pellicule (Friedman and Kolter, 2004). Dans le biofilm mature, Pel est retrouvé majoritairement au niveau de la tige du biofilm où il interagit avec l'eDNA, impliqué dans la formation d'un gradient de cations. Il est impliqué dans la résistance aux antibiotiques de type aminoglycoside (Colvin *et al.*, 2011). Psl est, quant à lui, retrouvé en périphérie du champignon où il assure la stabilité de la structure ainsi que sa protection du stress oxydatif et de la phagocytose par les neutrophiles (Mishra *et al.*, 2012).

L'alginate est un polysaccharide acétylé de charge négative, composé de résidus d'acides mannuronique et guluronique, dont la proportion influence la viscosité du biofilm (Evans and Linker, 1973). Il joue un rôle essentiel dans la fixation aux mucines retrouvées au niveau des voies respiratoires et son groupe acétylé accroît la viscosité du biofilm, facilitant l'accumulation d'eau et de nutriments. Un phénotype mucoïde est souvent observé lors d'infections chroniques à *P. aeruginosa* chez des personnes atteintes de mucoviscidose, et correspond à une surproduction d'alginate dans le biofilm. Le biofilm de type mucoïde devient alors plus compact et plus perméable aux antibiotiques et au système immunitaire, contribuant ainsi à la persistance de la bactérie à long terme (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2023).

Enfin, le biofilm contient des rhamnolipides qui sont des biosurfactants qui favorisent la dispersion et la colonisation de nouvelles niches. Ils jouent un rôle majeur dans l'altération des jonctions serrées

des cellules épithéliales des voies respiratoires et favorisent le swarming en réduisant la tension de surface (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2023). L'ensemble des acteurs impliqués dans la formation du biofilm sont résumés dans le **Tableau 2**. Ce tableau témoigne des nombreuses modifications métaboliques nécessaires à la transition d'un mode de vie planctonique vers celui de biofilm chez *P. aeruginosa*.

**Tableau 2 :** Facteurs de virulence clés dans la formation et le développement du biofilm chez *P. aeruginosa*.

Étapes	Facteurs de virulence	Gènes impliqués	Fonction associée	Rôle
Motilité et attachement	Flagelle	Opéron <i>flg, fli</i> et <i>flh</i>	Mobilité de type swimming et swarming	Attachement réversible à la surface (flagelle polaire)
	Pili de type IV	<i>pilABCD, flp, tad, afimU, fimV</i>	Mobilité de type twitching	Attachement irréversible à la surface par création d'une tension de surface
	Adhésines	Opéron <i>cupABCDE, bapA</i>	Attachement à la surface et aux cellules de l'hôte	Fixation irréversible à la surface
	Lectines	<i>lecA, lecB</i>	Adhérence aux cellules épithéliales	Fixation irréversible à la surface
Formation du biofilm	Pel et Psl	Opéron <i>pel</i> et <i>psl</i>	Composant de l'EPS	Initiation et maintien des interactions entre cellules
	Alginate	Opéron <i>alg</i>	Composant de l'EPS	Fixation aux mucines et viscosité du biofilm
	eDNA	Lyse cellulaire	Composant de l'EPS	Tolérance aux antibiotiques
	Rhamnolipides	<i>rhlABC</i>	Biosurfactant	Dispersion et colonisation de nouvelles niches
	Glycine bêtaïne	<i>betAB</i>	Biosurfactant	Dispersion et colonisation de nouvelles niches

### 4.3 Facteurs impliqués dans la transition vers le mode de vie sessile

La transition d'un mode de vie planctonique à celui de biofilm implique une cascade de modifications cellulaires chez la bactérie telles que la répression du flagelle, la production de facteurs de virulence ou encore la production des composants de la matrice extracellulaire (EPS). Ces modifications vont principalement être orchestrées par les niveaux intracellulaires en acide cyclique-3'-5'-diguanylique (c-di-GMP) dont les niveaux intracellulaires augmentent lors de l'adhésion irréversible d'une bactérie à une surface. Ceci va conduire à la liaison du c-di-GMP à FleQ, un régulateur transcriptionnel majeur de la biosynthèse du flagelle, conduisant à la répression de la motilité flagellaire chez la bactérie (Baraquet *et al.*, 2012). L'attachement irréversible à la surface initie également la transcription *d'algC*, un gène impliqué dans la biosynthèse du core lipopolysaccharidique et des alginates mais aussi l'induction des gènes impliqués dans la biosynthèse de Psl (Sauer *et al.*, 2022).

Les niveaux intracellulaires en c-di-GMP sont orchestrés par les diguanylates cyclases (DGC) qui permettent la synthèse de c-di-GMP à partir de deux molécules de GTP et les phosphodiesterases (PDE) permettant la dégradation du c-di-GMP en pGpG ou GMP (Valentini and Filloux, 2016). Ces niveaux sont ajustés en réponse à des signaux environnementaux perçus principalement par le système Gac/Rsm, mais aussi en réponse à la densité cellulaire de la population bactérienne, régulé par le quorum sensing (QS). Ces deux mécanismes de régulation seront développés dans le chapitre 3, section « Régulation de l'homéostasie du fer ».

## Chapitre II : Le fer





## 1 L'importance du fer en biologie

Comme la très grande majorité des organismes vivants, *P. aeruginosa* a besoin de fer pour sa croissance. En effet, seuls quelques organismes vivants n'utilisent pas le fer dans leurs processus biologiques. C'est le cas notamment de certaines espèces de *Lactobacillus* comme *Lactobacillus plantarum* (Archibald, 1983) présentes au sein du microbiote intestinal, ou encore du spirochète *Borellia burgdorferi*, agent étiologique de la maladie de Lyme ou borréliose (Troxell *et al.*, 2012). Chez ces organismes, d'autres métaux de transition, tels que le cuivre, le cobalt ou le nickel, sont utilisés à la place du fer (Frey and Reed, 2012).

Le fer est essentiel à la croissance de nombreux organismes vivants car il joue un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques tels que la fixation d'azote (nitrogénase), la respiration aérobie (ferredoxine, cytochrome P450), la biosynthèse d'ADN et d'ARN (cofacteurs des hélicases, nucléases, glycolases et déméthylases) ainsi que dans certains mécanismes de réparation de l'ADN (enzymes impliquant des clusters fer-soufre (4Fe-4S)) ou encore la photosynthèse (cytochrome C). Le fer intervient dans ces différents systèmes biologiques en raison de ses propriétés chimiques et physiques uniques, qui en font un élément idéal pour de nombreuses réactions biochimiques essentielles. En effet, sa capacité à exister en milieu biologique sous deux états d'oxydation, en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et en ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) lui confère une grande réactivité rédox, ce qui le rend indispensable dans de nombreux processus enzymatiques et métaboliques. Cette propriété est notamment essentielle pour le transport d'électrons (respiration cellulaire) ou pour des réactions enzymatiques oxydo-réductrices. De plus, sa faculté à former des complexes avec divers ligands lui permet d'interagir avec de nombreuses biomolécules et de participer à des réactions catalytiques essentielles (Sánchez *et al.*, 2017).

Le rôle central du fer dans une multitude de processus biologiques s'explique en grande partie par son abondance dès l'apparition des premières formes de vie sur Terre. Le fer est en effet un élément d'une grande stabilité nucléaire, ce qui explique pourquoi il représente 32 % de la masse totale de la Terre et qu'il est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre (6,3 %) (Frey and Reed, 2012). Les premiers Archées et bactéries anaérobies ont donc évolué dans un environnement où le

fer sous forme réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ ) était omniprésent et soluble. Cependant, la « Grande oxygénation », survenue il y a 2,5 milliards d'années, a profondément modifié l'atmosphère terrestre. Le développement des organismes photosynthétiques a en effet entraîné une émission continue d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) dans l'atmosphère, la rendant progressivement oxydante. Cette transition a favorisé l'oxydation du fer en fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ), beaucoup moins soluble, réduisant ainsi drastiquement sa biodisponibilité pour les organismes vivants (Frey and Reed, 2012). Cette réduction de la biodisponibilité du fer a eu des conséquences profondes sur la physiologie et la biologie des systèmes vivants. Les bactéries, notamment, ont dû adapter leurs mécanismes d'acquisition du fer pour survivre dans ce nouvel environnement plus oxygéné. Comme nous allons le voir ci-dessous, de nombreuses espèces ont développé des systèmes complexes pour capter le fer, permettant ainsi de se procurer le fer ferrique malgré sa faible solubilité.

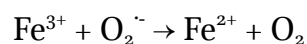
## 2 Contraintes du fer en biologie

Malgré ses capacités rédox remarquables, le fer présente de nombreuses contraintes en milieu biologique. En milieu aérobie, le fer est présent sous forme oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Dans cet état, le fer précipite rapidement sous forme d'hydroxyde de fer (III) ou d'oxyde hydraté de fer, rendant sa disponibilité extrêmement faible. La concentration de fer dans l'eau à pH physiologique est estimée à environ  $10^{-18}$  M (Sánchez *et al.*, 2017). Or, les bactéries requièrent une concentration en fer comprise entre  $10^{-5}$  et  $10^{-8}$  M pour croître dans des conditions optimales (Braun and Killmann, 1999).

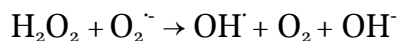
En milieu anaérobie, le fer est présent sous sa forme réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ ) qui est plus soluble en milieu aqueux. Sa concentration dans l'eau à pH physiologique est estimée à  $10^{-2}$  M (Sánchez *et al.*, 2017). Cependant, la présence de  $\text{Fe}^{2+}$  sous forme libre favorise la formation d'espèces réactives de l'oxygène, appelées ROS pour Reactive Oxygen Species (Andrews and Schmidt, 2007). En effet, en 1894, Fenton décrit pour la première fois les fortes propriétés d'oxydation d'un mélange de fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) appelé la réaction de Fenton (Fenton, 1894). Les espèces actives de la réaction ont par la suite été décrites par Haber et Weiss (Haber *et al.*, 1934) comme étant le radical hydroxyle  $\text{OH}^\cdot$  formé par le transfert d'un électron du  $\text{Fe}^{2+}$  vers le  $\text{H}_2\text{O}_2$  selon l'équation :



De plus, la présence de  $\text{Fe}^{3+}$  non protégé en milieu aqueux peut être suffisant pour également générer des radicaux  $\text{OH}^\cdot$  si le  $\text{Fe}^{2+}$  est formé par la réduction d'un électron, selon l'équation :



La combinaison des deux équations ci-dessus donne lieu à la réaction d'Haber Weiss :



Les deux formes du fer en milieu biologique sont donc capables de produire des ROS. Les ROS, et plus particulièrement les radicaux hydroxyl  $\text{OH}^{\cdot}$  réagissent avec tout type de biomolécules provoquant des dommages cellulaires irréversibles et conduisant dans les cas les plus graves à la mort cellulaire (Winterbourn, 1995).

Bien que sa concentration reste globalement faible, en particulier en conditions aérobies, le fer peut directement être disponible dans le milieu, sous forme d'ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ . En infection, le fer est principalement séquestré par des protéines de l'hôte telles que la transferrine et la lactoferrine. Ces sources de fer seront exploitables par les pathogènes par la production de sidérophores et l'expression de récepteurs spécialisés permettant la libération du fer de ces protéines. L'hème et les hémoprotéines constituent également des sources de fer, accessibles notamment *via* la sécrétion d'hémophores et la présence de récepteurs spécialisés. Dans les milieux naturels tels que les sols, le fer est principalement présent sous la forme de minéraux et d'oxydes de fer ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), que les bactéries pourront solubiliser *via* des processus biochimiques tels que l'acidification locale, la production de sidérophores ou la réduction enzymatique. Ces mécanismes sont finement régulés pour optimiser l'acquisition du fer en fonction des conditions environnementales.



# Chapitre III : Homéostasie du fer chez les bactéries à Gram négatif



Face à ce paradoxe où le fer est à la fois essentiel à la croissance et à la survie des organismes vivants, mais toxique et peu biodisponible en milieu biologique, les bactéries ont développé diverses stratégies adaptatives pour en assurer une acquisition efficace. Ces mécanismes reposent sur l'acquisition du fer ferrique, du fer ferreux et de l'hème. La capture du fer ferrique implique l'utilisation de sidérophores et cette stratégie constitue la principale voie d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram négatif.

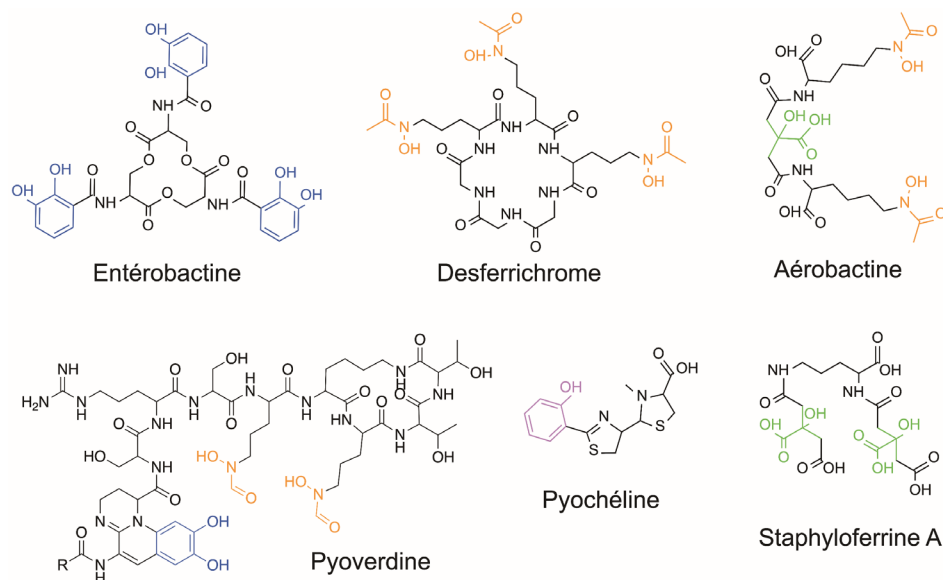
## 1 Import du fer ferrique par les bactéries

### 1.1 Les sidérophores ou porteurs de fer

Les sidérophores sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire (150 à 2000 Da) caractérisés par une affinité et une sélectivité élevée pour les ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Leur affinité pour le fer ferrique varie entre  $10^{18} \text{ M}^{-2}$  et  $10^{49} \text{ M}^{-1}$ , valeurs correspondant respectivement à celle de la pyochéline (PCH) et de l'entérobactine (ENT) pour l'ion ferrique (Tableau 3) (Hider and Kong, 2010). Le rôle des sidérophores est de chélater le fer ferrique présent dans l'environnement bactérien et de faciliter son import dans les bactéries. Le terme sidérophore fait d'ailleurs référence au rôle biologique de ce transporteur de fer puisqu'il provient du grec *sideros* (-fer) et *phoros* (-porter ou -transporter). Le ferrichrome A a été le premier sidérophore à être découvert. Il a été isolé en 1952 par John Brian Neilands d'une culture du mycète phytopathogène *Ustilago sphaerogena* (Neilands, 1952). Ce n'est que quatre ans plus tard que Neilands démontra avec Garibaldi le rôle biologique des sidérophores dans la chélation et le transport du fer dans la cellule (Garibaldi and Neilands, 1956). Depuis, plus de 500 sidérophores aux structures chimiques variées ont été identifiés, témoignant de leur remarquable diversité dans le monde vivant (Hider and Kong, 2010).

Les sidérophores sont classés en quatre classes, en fonction des groupements chélateurs qu'ils possèdent. Les principales fonctions chélatrices trouvées chez les sidérophores sont les groupements bidentates de type catéchol (comme dans le cas de l'entérobactine), hydroxamate (ferrichrome), hydroxycarboxylate (staphyloferrine A) ou phénolate (comme la pyochéline), capables de former des liaisons de coordination avec le fer. Les sidérophores peuvent présenter des groupements bidentates identiques ou différents ; on parle dans ce second cas de sidérophores mixtes. C'est le cas notamment de la pyoverdine (PVD) qui possède deux groupements hydroxamates

et un groupement catéchol (Figure 5) (Hider and Kong, 2010). La nature du groupement chélateur des sidérophores dépend de l'espèce productrice. Les entérobactéries, produisent principalement des catéchols (ENT), tandis que les mycètes et certaines bactéries environnementales, privilégient les hydroxamates. *P. aeruginosa*, une bactérie ubiquiste, synthétise la PVD, un sidérophore mixte. Cette diversité reflète ainsi l'adaptation des microorganismes à leur milieu.



**Figure 5 :** Structure des sidérophores et de leurs fonctions chélatrices. En bleu, les groupements catéchols, en orange les groupements hydroxamates, en vert les groupements carboxylates et en rose les groupements phénolates. Certains sidérophores, dits mixtes, possèdent plusieurs types de groupements chélateurs (aérobactine, pyoverdine).

Les sidérophores présentent généralement une structure hexadentate. Dans ce cas, un sidérophore suffit pour chélater l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en raison de la coordination octaédrique qui se forme avec le fer qui rend le complexe stable. Les sidérophores peuvent également avoir une structure bidentate, tridentate ou tétradentate : dans ce cas, plusieurs sidérophores sont alors nécessaires pour permettre une interaction stable et une coordination complète avec l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ces sidérophores présentent généralement une affinité plus faible pour les ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Tableau 3) (Hider, 1984; Boukhalfa and Crumbliss, 2002). Les sidérophores sont également capables de chélater d'autres métaux utilisés en biologie comme le cuivre, le cobalt ou encore le nickel, mais aussi des métaux toxiques comme l'aluminium, le gallium ou le plomb mais ce, avec une plus faible affinité que celle pour le fer (Hernlem *et al.*, 1996; Neubauer *et al.*, 2000).



**Tableau 3 :** Tableau général de l'affinité des sidérophores pour les ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ). La valeur pFe exprime de manière standard l'affinité d'un ligand L (ici, un sidérophore) pour le fer. Elle se définit par le logarithme négatif (base 10) de la concentration en ions ferriques libres en solution lorsque le ligand est à l'équilibre avec le fer lorsque :  $[Fe(III)]_T = 10^{-6} M$  ;  $[L] = 10^{-5} M$  et  $pH = 7.4$ . La constante d'affinité ( $K_a$ ) peut, quant à elle, varier en fonction du pH de l'environnement.

Sidérophore (L)	Groupement chélateur	L : Fe (III)	pFe (III)	$K_a$	Référence
<b>Entérobactine</b>	Catéchol	1 : 1	35.5	$10^{49} M^{-1}$	(Loomis and Raymond, 1991)
<b>Protochéline</b>	Catéchol	1 : 1	27.7	$10^{43} M^{-1}$	(Cornish and Page, 2000)
<b>Pyoverdine</b>	Catéchol / hydroxamate	1 : 1	27	$10^{32} M^{-1}$	(Albrecht-Gary <i>et al.</i> , 1994)
<b>Nocardamine</b>	Hydroxamate	1 : 1	27.7	$10^{32} M^{-1}$	(Anderegg <i>et al.</i> , 1963a)
<b>Desferrioxamine B</b>	Hydroxamate	1 : 1	26.6	$10^{30} M^{-1}$	(Schwarzenbach and Schwarzenbach, 1963)
<b>Desferrichrome</b>	Hydroxamate	1 : 1	25.2	$10^{29} M^{-1}$	(Anderegg <i>et al.</i> , 1963b)
<b>Ferricrocine</b>	Hydroxamate	1 : 1	26.5	-	(Wong <i>et al.</i> , 1983)
<b>Ferrichrysine</b>	Hydroxamate	1 : 1	25.8	-	(Anderegg <i>et al.</i> , 1963b)
<b>Acide rhodotorulique</b>	Hydroxamate	3 : 2	21.8	$10^{31} M^{-1}$	(Carrano <i>et al.</i> , 1979)
<b>Coprogène</b>	Hydroxamate	1 : 1	27.5	-	(Wong <i>et al.</i> , 1983)
<b>Pyochéline</b>	Hydroxyphenylthiazolone	2 : 1	16	$10^{18} M^{-2}$	(Brandel <i>et al.</i> , 2012)
<b>Yersiniabactine</b>	Hydroxyphenylthiazolone	1 : 1	-	$10^{37} M^{-1}$	(Perry <i>et al.</i> , 1999)
<b>Rhizoferrine</b>	Acide carboxylique	2 : 1	20.0	$10^{25} M^{-1}$	(Carrano <i>et al.</i> , 1996)
<b>Aérobactine</b>	Hydroxycarboxylate	1 : 1	23.4	$10^{23} M^{-1}$	(Neilands, 1981)
<b>Schizokinen</b>	Hydroxycarboxylate	1 : 1	26.8	$10^{36} M^{-1}$	(Chuljerm <i>et al.</i> , 2019)

Les sidérophores sont synthétisés dans le cytoplasme par un processus enzymatique (Crosa and Walsh, 2002; Miethke and Marahiel, 2007; Khan *et al.*, 2018). La synthèse démarre à partir de précurseurs qui peuvent être des acides aminés ou d'autres petites molécules qui vont subir une polycondensation catalysée par des synthétases de sidérophores. Ces enzymes génèrent alors des structures cycliques ou linéaires capables de capter le fer et qui sont propres à chaque sidérophore. Les synthétases impliquées sont soit des peptides synthétases non-ribosomiaux (NRPSs) qui assemblent le précurseur du sidérophore en liant les acides aminés un à un comme c'est le cas pour la pyoverdine, soit des polycétides synthèses (PKSs) qui eux assemblent les unités acétyl, malonyl et methylmalonyl pour former généralement des polycétides comme c'est le cas de la yersiniabactine. Des modifications de type acylation et cyclisation peuvent ensuite être nécessaires pour la

maturation du sidérophore (Bearden *et al.*, 1997; Schalk *et al.*, 2020). Une fois le sidérophore synthétisé, il est alors exporté hors de la cellule par des pompes à efflux.

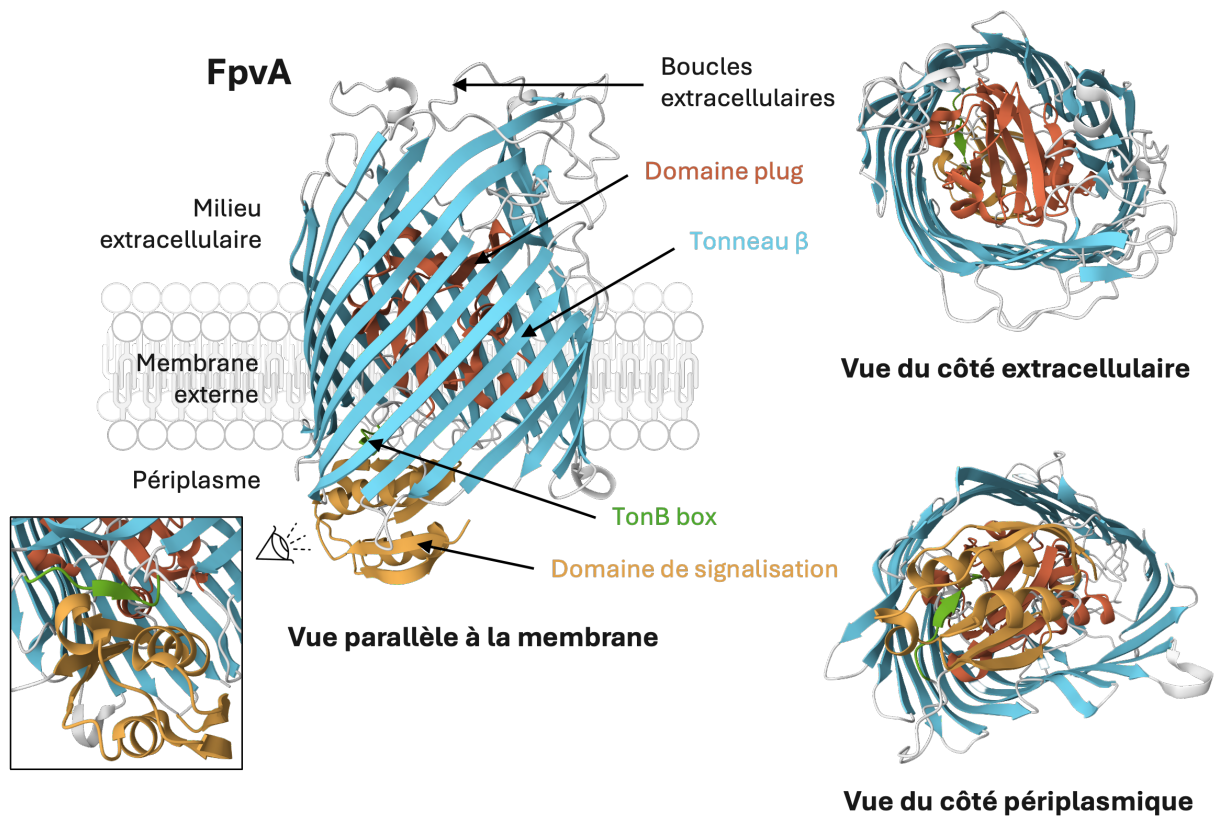
Souvent, les bactéries produisent leurs propres sidérophores, mais peuvent aussi utiliser les sidérophores produits par d'autres microorganismes, appelés xénosidérophores, dans une stratégie de « piratage » du sidérophore. Cette stratégie leur permet à la fois de s'affranchir du coût énergétique associé à la synthèse de ces molécules et de leur conférer un avantage sélectif en milieu compétitif (Wilson *et al.*, 2016).

## 1.2 L'import au travers de la membrane externe, les transporteurs TonB-dépendants (TBDT)

### 1.2.1 Structure et rôle des TBDTs

La membrane externe bactérienne constitue une barrière semi-perméable qui régule sélectivement le passage des molécules. Si certaines molécules peuvent diffuser de manière passive *via* les porines, d'autres, comme les sidérophores, rencontrent des restrictions. En effet, les molécules en faible concentration dans le milieu extracellulaire ainsi que celles dont la masse moléculaire excède les 600 Da ne peuvent pas diffuser. Leur transport à travers la membrane externe nécessite des systèmes spécialisés appelés transporteurs TonB-dépendant (TBDT) (Nikaido *et al.*, 1993).

Les TBDTs constituent une famille de protéines membranaires hautement conservées et localisées dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. À ce jour, plus de 40 structures de TBDTs ont été publiées dans la littérature. Leur structure comprend, à l'extrémité C-terminale, un tonneau  $\beta$  constitué de 22 brins antiparallèles reliés entre eux par de larges boucles extracellulaires et de petites boucles périplasmiques. À l'extrémité N-terminale, on trouve un domaine globulaire appelé « plug » ou « bouchon », composé d'un feuillet  $\beta$  mixte à quatre brins (Figure 6) (Cobessi *et al.*, 2005; Brillet *et al.*, 2007; Moynié *et al.*, 2017, 2019). Le tonneau  $\beta$  forme un pore central d'environ 70 Å de hauteur dans la membrane externe (Schalk *et al.*, 2012). Ce pore est entièrement obstrué par le domaine N-terminal globulaire (Figure 6) (Noinaj *et al.*, 2010). Le site de liaison du TBDT est localisé sur le côté extracellulaire du domaine bouchon et est composé de résidus du bouchon et du tonneau.



**Figure 6 :** Structure aux rayons X du TBDT FpvA de *P. aeruginosa* (PDB 205P) (Brillet *et al.*, 2007). En bleu est représenté le tonneau  $\beta$  à 22 brins antiparallèles, en rouge le bouchon, en vert la TonB box et en jaune le domaine de signalisation (domaine d'interaction avec le facteur anti-sigma ECF et uniquement présent chez les TBDTs dont la régulation est dépendante des facteurs sigma/antisigma).

Le transport des ligands par les TBDTs est énergie dépendant et nécessite l'action de la machinerie TonB (d'où leur appellation de transporteur TonB-dépendant). La machinerie TonB est composée de trois protéines TonB, ExbB et ExbD localisées dans la membrane interne qui va fournir au TBDT l'énergie nécessaire à l'ouverture du canal et au passage du ferri-sidérophore. La reconnaissance et l'interaction entre la machinerie TonB et le TBDT s'effectuent *via* la TonB box, une séquence conservée d'environ 4 à 7 acides aminés, localisée au niveau N-terminal avant le domaine « bouchon » du transporteur. Les bactéries possèdent plusieurs centaines de copies d'un même TBDT mais seulement une centaine de copies de TonB. Les TBDTs ne sont donc pas constamment associés à une machinerie TonB, et le seront uniquement lors de la liaison d'un complexe ferri-sidérophore au site de liaison du TBDT (Higgs *et al.*, 2002; Noinaj *et al.*, 2010).

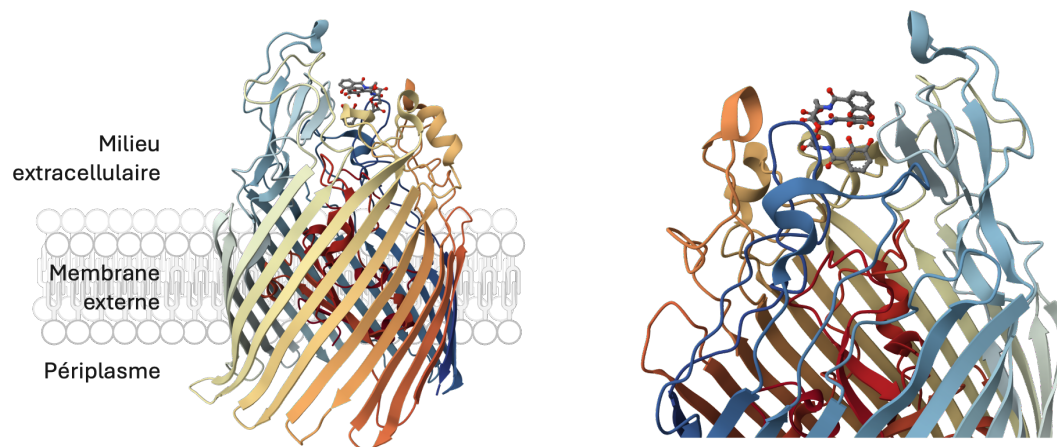
En plus d'une fonction de transport, certains TBDTs possèdent également une fonction de signalisation avec la présence d'un domaine de signalisation appelé SD au niveau N-terminal, après

la TonB-box. Le domaine de signalisation se compose de 2 hélices alpha parallèles comprises entre deux feuillets  $\beta$  composés de 2 ou 3 brins  $\beta$  (Figure 6) (Josts *et al.*, 2019). Sa position dépend de la liaison du complexe ferri-sidérophore au TBDT : en l'absence de ligand, le SD lie la TonB-box, tandis que sa fixation conduit à leur dissociation et à l'orientation du SD vers le périplasme, où il pourra alors exercer sa fonction de signalisation. Le domaine de signalisation est retrouvé notamment chez les TBDTs FecA d'*Escherichia coli* (Ferguson *et al.*, 2002; Garcia-Herrero and Vogel, 2005) et FpvA de *P. aeruginosa* (Figure 6) (Cobessi *et al.*, 2005; Wettstadt *et al.*, 2024).

### 1.2.2 Sélectivité de transport des TBDTs

Le site de liaison des TBDTs est très spécifique pour un sidérophore donné ou des sidérophores structurellement très proches et lie les complexes ferri-sidérophores avec une affinité de l'ordre du 0,1-5 nM, quel que soit le TBDT (Schalk *et al.*, 2012). Cette sélectivité de liaison et donc de transport pour un ligand donné implique que les bactéries possèdent plusieurs gènes codant pour des TBDTs dans leur génome, à savoir un pour chaque sidérophore ou famille de sidérophores transportés. En plus de l'acquisition des complexes ferri-sidérophores, les TBDTs sont également impliqués dans l'import de la vitamine B12 appelée cobalamine (Gudmundsdottir *et al.*, 1989), d'autres métaux comme le cuivre et le zinc, de polysaccharides ou d'antibiotiques comme l'albomycine, dont la structure est très proche de celle du sidérophore ferrichrome (Ferguson *et al.*, 2000). Les TBDTs peuvent également être des voies d'entrée pour les bactériophages.

Les structures aux rayons X de PfeA et FoxA chez *P. aeruginosa* ont montré, pour ces TBDTs, la présence d'un second site de liaison localisé dans les boucles extracellulaires ; le premier site, commun à tous les TBDTs, est, quant à lui, formé de résidus du bouchon et du tonneau (Figure 7) (Moynié *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2023). La reconnaissance du complexe ferri-sidérophore avec le TBDT s'opère, dans ce cas, en deux étapes. Elle implique d'abord une reconnaissance au niveau du site de liaison situé au niveau des larges boucles extracellulaires du tonneau  $\beta$  ; puis le complexe ferri-sidérophore migre vers le site situé sur le bouchon (Josts *et al.*, 2019; Moynié *et al.*, 2019). Pour le moment, il n'est pas sûr que tous les TBDTs possèdent également ce site de liaison au niveau des boucles extracellulaires.



**Figure 7** : Structure aux rayons X de PfeA-ferri-ENT de *P. aeruginosa* (PDB 6Q5E) (Moynié *et al.*, 2019). Le site de liaison est localisé au niveau des larges boucles extracellulaires du tonneau  $\beta$ .

La liaison du complexe ferri-sidérophore au site de liaison situé sur le bouchon se fait en absence d'énergie fournie par la force proton motrice (PMF) et entraîne une transduction du signal vers la TonB box localisée dans le périplasmе. La TonB box pourra alors interagir au niveau périplasmique avec la protéine TonB, nécessaire au passage du substrat dans le canal.

### 1.2.3 Machinerie TonB et transport du ferri-sidérophore à travers la membrane externe

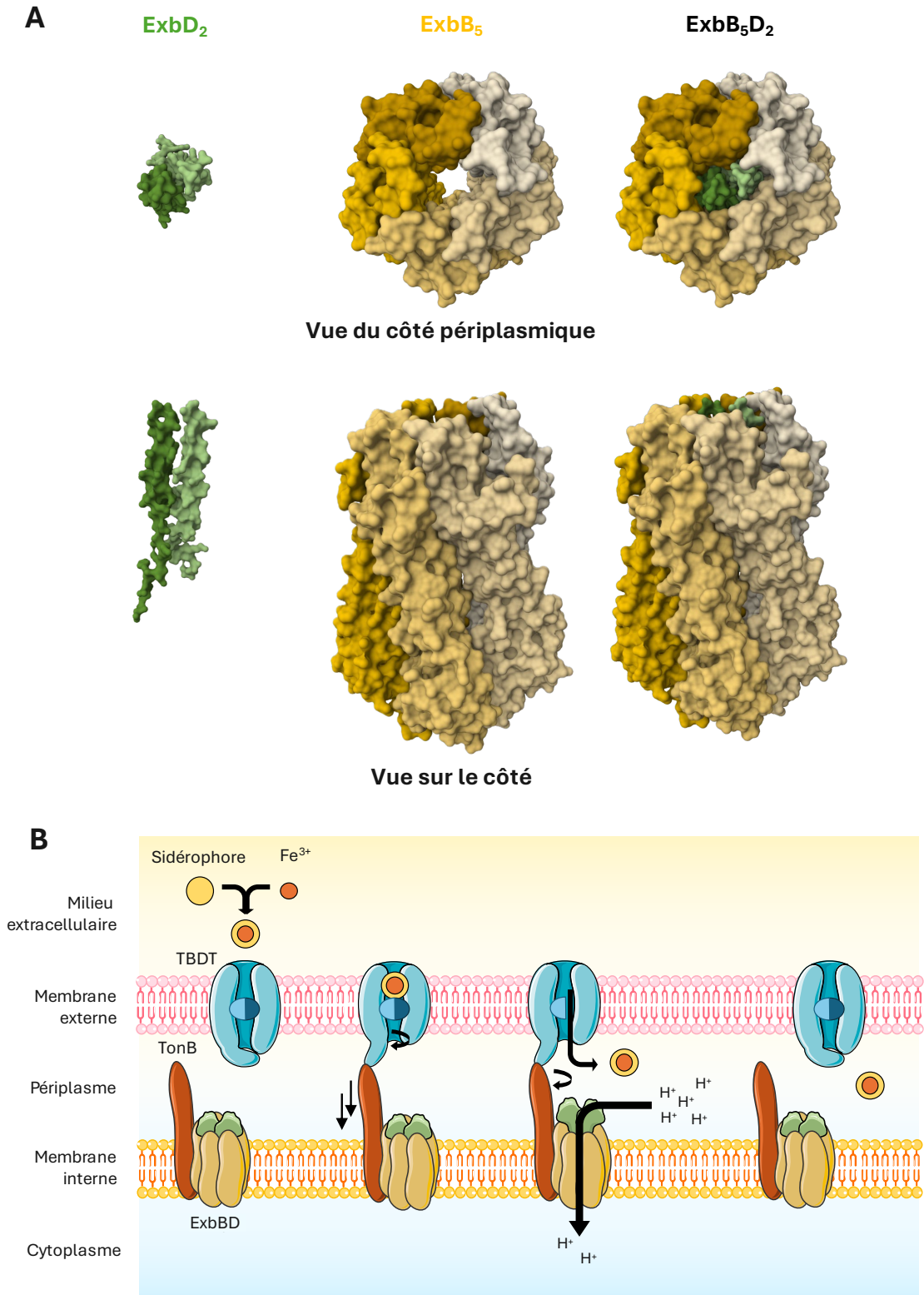
La machinerie TonB est localisée dans la membrane interne et se compose de 3 protéines transmembranaires TonB, ExbB et ExbD, avec une stœchiométrie de 1 : 5 : 2 (TonB : ExbB : ExbD) (Celia *et al.*, 2016). La machinerie TonB sert de canal à protons qui permet de transférer l'énergie provenant de la PMF de la membrane interne à la membrane externe.

TonB est une protéine transmembranaire composée d'une hélice alpha en N-terminal ancrée dans la membrane interne et interagissant avec ExbB, d'une région intermédiaire riche en proline et d'un domaine globulaire mixte en C-terminal localisé dans le périplasmе et qui lie le TBDT au niveau de la TonB box (Celia *et al.*, 2019). Plus récemment, un motif hautement conservé appelé D-box a été décrit comme point d'attache pour ExbD et jouant un rôle majeur dans la transduction de la PMF entre les deux membranes plasmiques (Loll *et al.*, 2024). ExbB est un pentamère composé de 5 brins  $\beta$  mixtes qui forment un pore central hydrophobe au sein de la membrane interne (**Figure 8A**) (Celia

*et al.*, 2019). Ce canal est obstrué du côté périplasmique par les deux hélices alpha formant le dimère ExbD.

La liaison du complexe ferri-sidérophore au niveau du site de liaison du TBDT conduit à des changements allostériques au sein du TBDT qui vont rendre la TonB box accessible au niveau périplasmique. L'accessibilité de la TonB box va permettre l'interaction avec le domaine C-terminal de TonB (interaction 1 : 1). Il est important de noter qu'il s'agit de la structure et non de la séquence de la TonB box qui joue un rôle important dans cette interaction (Ogierman and Braun, 2003). Au niveau du complexe ExbBD a alors lieu un changement conformationnel d'ExbD d'un état fermé à ouvert qui se traduit par la rotation d'ExbD dans l'anneau formé par ExbB. Cette rotation implique la translocation de protons au travers du canal formé par le pentamère ExbB, *via* la déprotonation et reprotonation de l'aspartate 25 d'ExbD (Ratliff *et al.*, 2022; Rieu *et al.*, 2022). Cette rotation de ExbD est également favorisée par la couche de peptidoglycanes du périplasma qui sert d'ancrage pour ce mécanisme et favorise la dissociation des dimères de ExbD (Zinke *et al.*, 2024). L'énergie produite par la génération de ce gradient de protons est alors transduite à TonB, qui à son tour énergiise le TBDT par son interaction avec la TonB box. L'énergie sera en effet fournie par la rotation du domaine rigide riche en proline de TonB. Une partie du bouchon subit alors une modification conformationnelle permettant le passage du substrat dans le canal (Figure 8B) (Zinke *et al.*, 2024). Lorsque le substrat a atteint le périplasma, le domaine bouchon se repositionne dans le lumen du canal pour éviter tout transport aspécifique. Le turnover de la machinerie TonB permet ainsi la prise en charge rapide de multiples TBDTs (Grinter and Lithgow, 2019).





**Figure 8 :** Fonctionnement de la machinerie TonB-ExbBD. **A.** Structure du dimère ExbD (en vert), du pentamère ExbB (en orange) et du complexe actif ExbB<sub>5</sub>D<sub>2</sub> (PDB 6TYI) (Celia *et al.*, 2019). **B.** Mécanisme de transport dépendant de la machinerie TonB-ExbBD. Le complexe ferri-sidérophore formé interagit avec son site de liaison sur le TBDT. Cette reconnaissance permet le recrutement de la machinerie TonB-ExbBD. L'internalisation des protons par le complexe ExbBD fournit alors l'énergie à TonB, qui, par une rotation de son domaine riche en proline va énergiser à son tour le TBDT, conduisant au passage du complexe à travers le TBDT.

### 1.3 Devenir des complexes ferri-sidérophores après passage au travers de la membrane externe

Après le passage à travers la membrane externe, le devenir des complexes ferri-sidérophores dans le périplasma dépendra de la nature du sidérophore et des espèces bactériennes. Deux scénarios sont possibles : le premier est la dissociation du fer du sidérophore au niveau du périplasma, la seconde est le transport du complexe ferri-sidérophore à travers la membrane interne avec un relargage du fer au niveau cytoplasmique (Schalk and Guillon, 2013). Ce transport des complexes ferri-sidérophores au travers de la membrane externe est généralement assuré par des transporteurs de type ABC (pour ATP-Binding Cassette) dont le fonctionnement est dépendant de l'hydrolyse d'ATP. Dans certains cas, cet import s'effectue également *via* des perméases qui sont, quant à elles, dépendantes de la PMF (Figure 9) (Ó Cuív *et al.*, 2004).

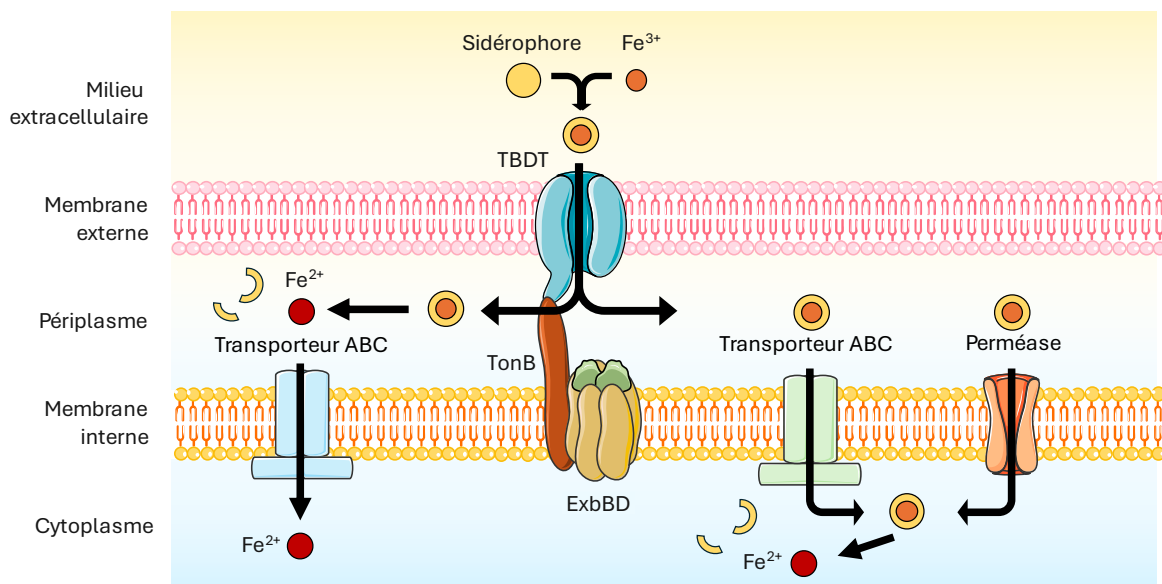


Figure 9 : Devenir du fer dans la cellule. La dissociation du fer du sidérophore est dépendante du sidérophore : elle s'effectue soit dans le périplasma, soit dans le cytoplasme mais s'accompagne toujours d'une réduction du fer en ions  $Fe^{2+}$ .

Que ce soit dans le périplasma ou dans le cytoplasme, la dissociation du fer des sidérophores implique toujours une réduction du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) pouvant être soit associée à une modification chimique ou à une hydrolyse du sidérophore. La présence d'un fort chélateur de fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) lors de cette réaction contribue également à déstabiliser le complexe ferri-sidérophore (Figure 9). L'efficacité de réduction du fer est dépendante à la fois de l'affinité du sidérophore pour le fer et de sa structure chimique (Harrison and Buckling, 2009). Ces mécanismes seront discutés plus en détail dans la partie suivante sur les voies d'import du fer chez *P. aeruginosa*.



Lorsque le fer se dissocie du sidérophore dans le périplasma, les ions  $\text{Fe}^{2+}$  traverseront activement la membrane interne *via* un transporteur ABC, différent de ceux utilisés pour le transport des complexes ferri-sidérophores (Brillet *et al.*, 2012). Les ions  $\text{Fe}^{2+}$  seront ensuite stockés dans le cytoplasme par des protéines de la famille des ferritines avant leur utilisation par la bactérie en cas de carence. Dans le cas de *P. aeruginosa*, deux types de protéines de stockage sont retrouvées au sein de la bactérie : une ferritine bactérienne nommée FtnA et une bactérioferritine (Bfr), appelée BfrB, complexée à une ferrédoxine, Bfd. Cette dernière permet de réduire les ions  $\text{Fe}^{3+}$ , permettant la libération du fer de la molécule sous forme ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Les Bfr sont des protéines de stockage produites uniquement par les Archées et les bactéries (Rivera, 2017).

#### 1.4 Import du fer ferrique lié à la transferrine et à la lactoferrine

Un dernier mécanisme intervient également dans l'import du fer ferrique et implique la reconnaissance de protéines telles que la transferrine ou la lactoferrine par des TBDTs. Ce système est retrouvé uniquement chez les bactéries des familles *Neisseriaceae*, *Pasteurellaceae* et *Moraxellaceae*, et n'est donc pas présent chez *P. aeruginosa*. Il s'agit d'un système bipartite composé d'un TBDT, TbpA (Transferrin-binding protein A), et d'une lipoprotéine, TbpB, ancrée dans la membrane externe. TbpB va interagir avec la transferrine et faciliter sa liaison avec TbpA. Une fois la transferrine fixée, TbpA provoque un changement conformationnel de la transferrine, favorisant la libération des ions  $\text{Fe}^{3+}$ . Le fer libéré est ensuite réduit dans le périplasma par une réductase, puis transporté dans le cytoplasme *via* un transporteur ABC comme FbpABC (Figure 10) (Pogoutse and Moraes, 2017).

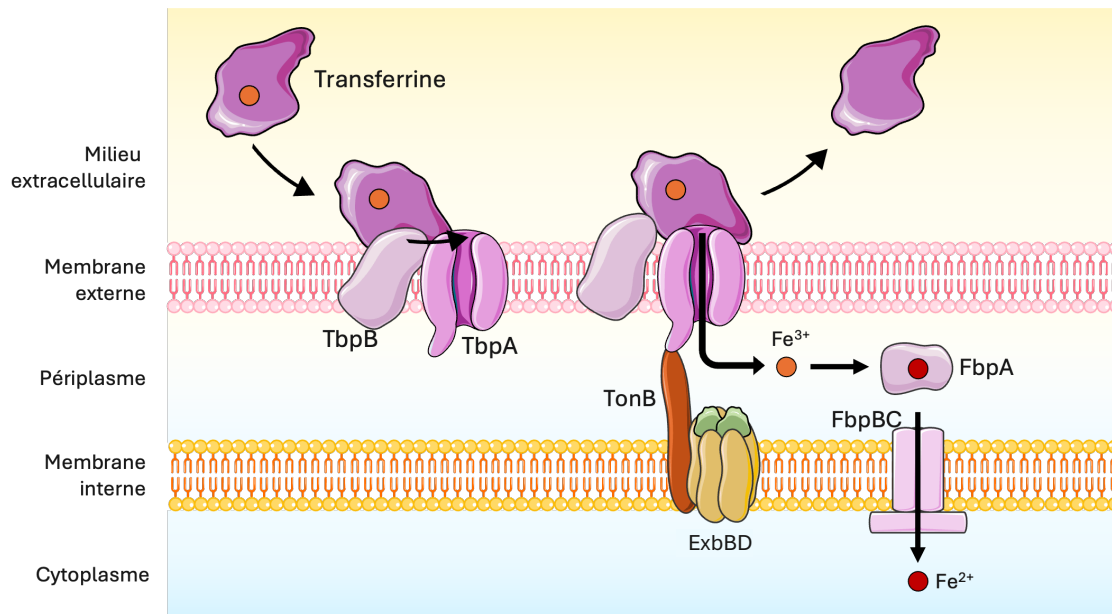


Figure 10 : Acquisition du fer ferrique par la transferrine chez les *Neisseriaceae*, *Pasteurellaceae* et *Moraxellaceae*.

## 2 Import du fer ferreux

Contrairement au fer ferrique, peu soluble et dépendant des sidérophores pour son acquisition, le fer ferreux, plus soluble, est directement assimilable par les bactéries. Il prédomine en conditions anaérobies, microaérobies, à pH acide et dans des environnements réducteurs, notamment au sein du tractus digestif et des poumons en cas de fibrose kystique (CF), également appelé mucoviscidose. Chez les bactéries à Gram négatif, les ions  $\text{Fe}^{2+}$  diffusent à travers la membrane externe *via* des porines, avant d'être pris en charge par des systèmes de transport spécifiques localisés dans la membrane interne (Figure 11) (Lau *et al.*, 2016).

Le système Feo (FeoABC) est le principal mécanisme d'acquisition du fer ferreux chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Il repose sur FeoB, une protéine transmembranaire dont le domaine N-terminal cytoplasmique possède une activité GTPasique, permettant le transport actif des ions  $\text{Fe}^{2+}$  à travers la membrane interne par l'hydrolyse du GTP. Deux protéines accessoires, FeoA et FeoC, participent au fonctionnement du système : FeoA, une protéine cytoplasmique à domaine SH3, interagit avec FeoB pour en moduler l'activité ; et FeoC, agirait comme un répresseur transcriptionnel dépendant du cluster Fe-S (Figure 11) (Cartron *et al.*, 2006). L'expression du système Feo est régulée par le répresseur Fur en fonction de la disponibilité en fer, et induite en conditions anaérobies *via* Fnr (Spiro and Guest, 1990). Ce système est également un facteur clé de la virulence

bactérienne et de la capacité des bactéries à coloniser l'intestin, où le fer ferreux prédomine (Lau *et al.*, 2016). Certaines bactéries à Gram négatif possèdent une voie alternative au système Feo, qui sont les systèmes Efe (EfeUOB) chez *E. coli* et Fet (FetMP) chez *Yersinia pestis*, analogues au système Ftr1/fet3 des levures (Große *et al.*, 2006). Ces systèmes de type ABC incluent EfeU, une perméase membranaire, EfeO, une chaperonne périplasmique et EfeB, une oxydase facilitant le passage des ions  $Fe^{2+}$  à travers EfeU, dont le fonctionnement est oxygène-dépendant (Figure 11) (Perry *et al.*, 2015).

Certaines bactéries à Gram négatif possèdent des systèmes de transport d'ions divalents permettant également l'import du fer ferreux à travers la membrane interne. C'est le cas du système Sit (SitABCD), présent chez *Shigella*, *Salmonella* et certaines souches pathogènes d'*E. coli*. Il s'agit d'un transporteur de type ABC composé de SitA, une perméase transmembranaire, SitB, un domaine de liaison à l'ATP et de deux protéines périphériques, SitC et SitD. L'hydrolyse de l'ATP par SitB va permettre l'import des ions divalents  $Mn^{2+}$  et  $Fe^{2+}$  à travers la membrane interne (Figure 11). Ce système possède un site de liaison à MntR, un régulateur du métabolisme du manganèse (Runyen-Janecky *et al.*, 2003). Ce système est homologue au système Yfe (YfeABCD) de *Yersinia pestis*, impliqué dans l'import du  $Fe^{2+}$ , du  $Fe^{3+}$  et du  $Mn^{2+}$  (Runyen-Janecky *et al.*, 2003). La protéine MntH de la famille des Nramp eucaryotiques (Natural resistant-associated macrophage protein), est un symporteur de protons et de métaux divalents ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) qui transporte préférentiellement le  $Mn^{2+}$ . Présente chez *Salmonella* et *E. coli*, elle exploite le gradient électrochimique des protons pour le transport des cations divalents (Figure 11). Son expression est régulée par MntR, en réponse à la concentration intracellulaire en  $Mn^{2+}$  (Koster, 2005). Enfin, ZupT, un transporteur membranaire de la famille Zip, assure l'import d'ions métalliques divalents ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ ) chez *E. coli*. Son mécanisme de transport, encore mal caractérisé, semble énergie-indépendant et reposerait sur une large spécificité de substrat (Figure 11) (Grass *et al.*, 2005).

L'acquisition du fer ferreux peut être facilitée chez certaines bactéries par la production de phénazines qui, grâce à leurs propriétés rédox, réduisent le fer et augmentent son accessibilité (Wang *et al.*, 2011; Cornelis and Dingemans, 2013).

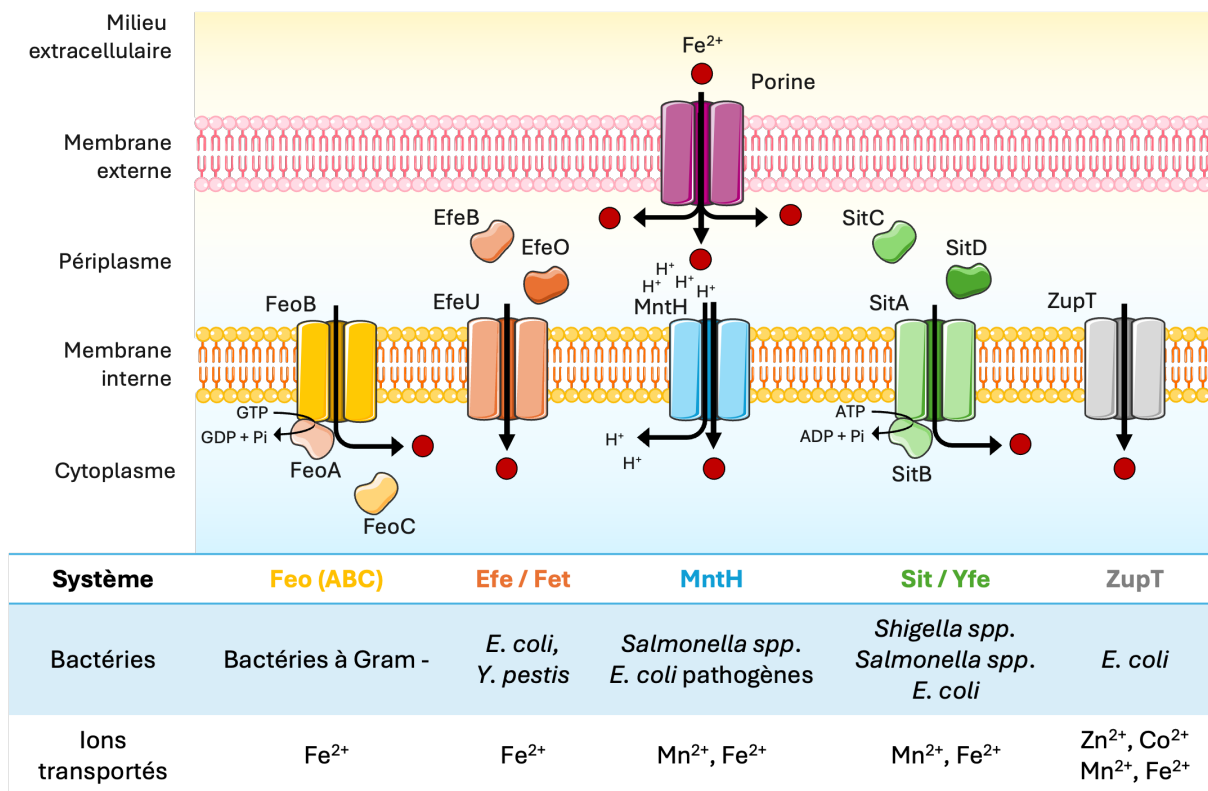


Figure 11 : Systèmes d'acquisition du fer ferreux retrouvés chez les bactéries à Gram négatif.

### 3 Import de l'hème

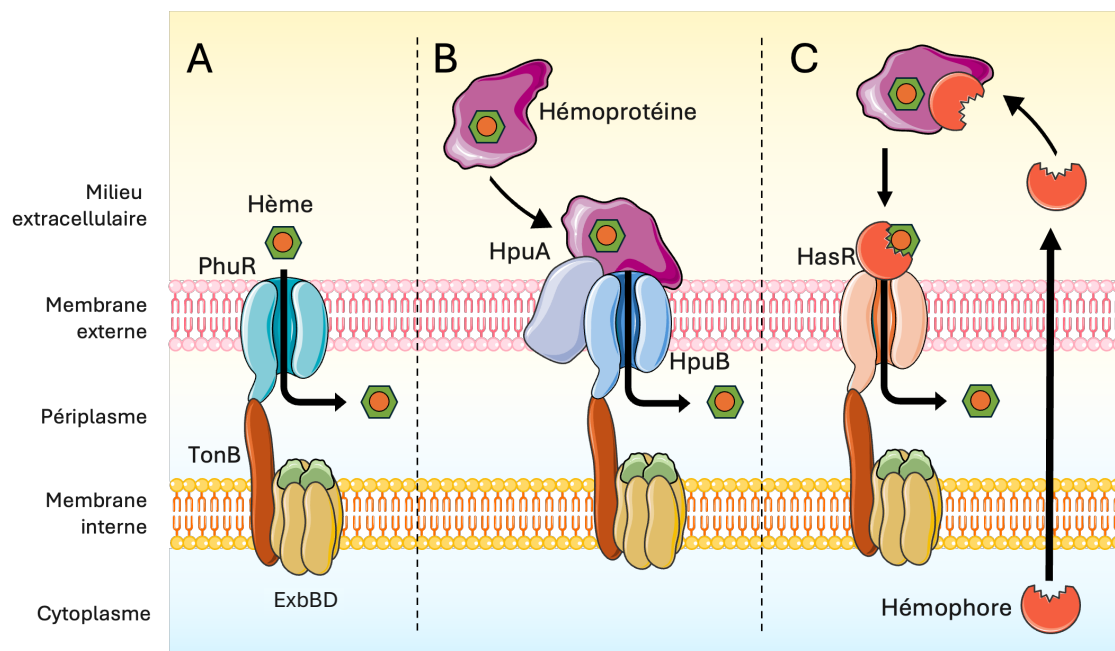
Chez l'Homme, le fer est majoritairement présent sous forme d'hème et constitue la principale source en fer des bactéries lors d'infections (Ochsner *et al.*, 2002). Il existe chez les bactéries à Gram négatif trois grandes stratégies d'acquisition de l'hème, l'une implique la production d'hémophores tandis que les deux autres non. Néanmoins, toutes impliquent des TBDTs, dont la spécificité de liaison varie en fonction de la stratégie d'acquisition.

La première stratégie consiste en l'import d'hème par les TBDTs où l'hème est directement reconnu au niveau de la membrane externe par des TBDTs spécifiques comme le système *hem* (HemRSTUV) chez *Yersinia enterocolitica* ou le système *phu* (PhuRSTUVW) chez *P. aeruginosa* (Figure 12A) (Stojiljkovic and Hantke, 1992; Tong and Guo, 2009). Ce dernier système sera détaillé dans le chapitre 4, consacré aux voies d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa*.

La deuxième stratégie implique la liaison des hémoprotéines de l'hôte comme l'hémoglobine au TBDT, dont la présence sera favorisée par la production d'hémolysines par les bactéries qui va permettre leur libération des érythrocytes. Ce système est retrouvé chez *Neisseria meningitidis* et

implique un système d'acquisition bipartite composé d'un TBDT, HpuB, et une lipoprotéine, HpuA, ancrée dans la membrane externe et associée à HpuB. Lorsque le complexe TBDT-hémoprotéine de l'hôte est formé, l'hème migre du site de liaison de l'hémoglobine sur le site de liaison du TBDT et est ensuite importé dans le périplasma (Figure 12B) (Lewis *et al.*, 1998; Tong and Guo, 2009).

Enfin, la troisième stratégie consiste en la **production d'hémophores** qui amènent l'hème au TBDT. Cette stratégie repose sur la synthèse et la sécrétion de petites protéines appartenant au groupe HasA (**H**ème **a**cquisition **s**ystem), initialement caractérisé chez *S. marcescens*, ou au groupe HxuA (**H**ème/**h**emopexin **u**tilization) identifié chez *Haemophilus influenzae*. Les hémophores se caractérisent par une très forte affinité pour l'hème qu'elles vont lier sous forme libre ou qu'elles vont extraire d'hémoprotéines. Le complexe hémophore-hème se lie ensuite à un TBDT spécifique et au sein de ce complexe, l'hème migre du site de liaison de l'hémophore vers celui du TBDT (HasR dans la cas du système *has*) (Figure 12C) (Cescau *et al.*, 2007).



**Figure 12 :** Systèmes d'import de l'hème chez les bactéries à Gram négatif. **A.** Import direct de l'hème par un TBDT du système phu (cas de *P. aeruginosa*). **B.** Liaison de l'hémoprotéine au TBDT par le biais du système bipartite HpuAB. **C.** Utilisation d'hémophores pour extraire l'hème des hémoprotéines et le délivrer au TBDT HasR.

Arrivé dans le périplasma, l'hème est transporté au travers de la membrane interne vers le cytoplasme par des transporteurs ABC spécifiques. Ce transport, dépendant de l'hydrolyse de l'ATP, est facilité par la liaison de l'hème à une protéine périplasmique (HTP ou HBP), qui va adresser

l'hème au transporteur et permettre son import dans le cytoplasme (Stojilkovic and Perkins-Balding, 2002). Dans le cytoplasme, l'hème est alors séquestré par des protéines spécifiques comme la protéine PhuS chez *P. aeruginosa* avant sa dégradation enzymatique par une hème oxygénase permettant la libération du fer (Wilks, 2002).

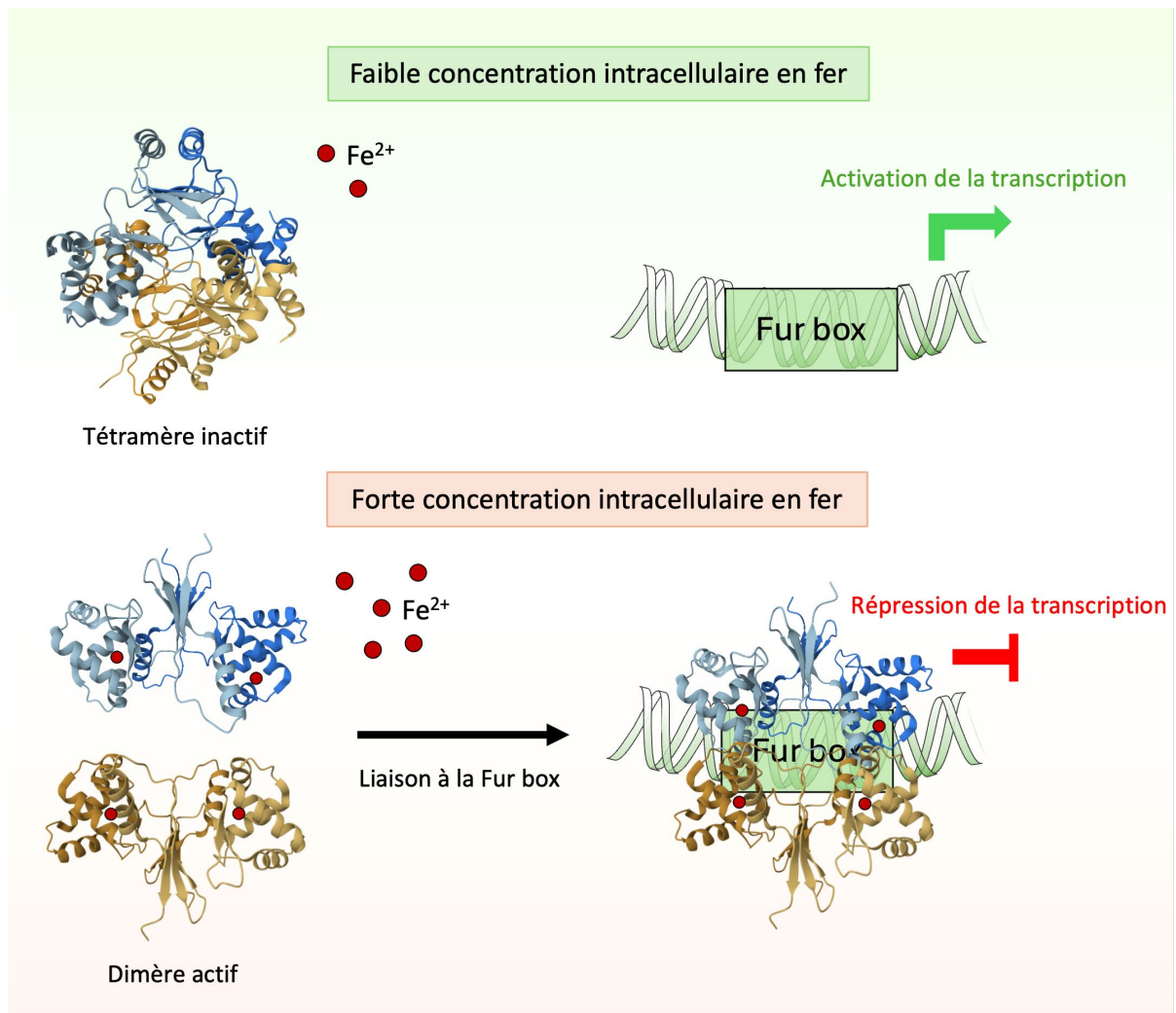
## 4 Régulation de l'acquisition du fer

La concentration intracellulaire en fer est soumise à une régulation stricte chez les bactéries à Gram négatif, du fait de son rôle essentiel dans la physiologie de la bactérie et sa toxicité. La régulation de la concentration intracellulaire en fer s'effectue au niveau de la transcription et de la post-transcription des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer. Ainsi, cette régulation permet aux bactéries d'exprimer la ou les voie(s) d'import du fer la (les) plus efficace(s) pour acquérir ce nutriment en fonction des conditions environnementales et des sources de fer. Cette régulation implique divers acteurs qui vont réguler soit négativement, soit positivement l'expression de ces voies.

### 4.1 Régulateurs globaux de carence en fer

#### 4.1.1 Le régulateur transcriptionnel Fur

La protéine Fur (Ferric Uptake Regulator) est le régulateur transcriptionnel global de l'homéostasie du fer chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Elle appartient à la super famille Fur des métallorégulateurs bactériens et son activité est dépendante de la disponibilité du fer dans la cellule (Escobar *et al.*, 1999). Lorsque la concentration intracellulaire en fer atteint un certain seuil, Fur lie le fer ferreux et adopte une conformation protéique dite « fermée » dans laquelle deux dimères de Fur se lient de part et d'autre de l'ADN au niveau d'une séquence consensus appelée « Fur box » pour laquelle ils présentent une forte affinité. Il s'agit d'une séquence palindromique de 19 nucléotides (5'GATAATGATAATCATTATC3') présente dans la région promotrice des gènes sous la régulation de Fur. Cette liaison bloque physiquement la liaison de l'ARN polymérase, empêchant la transcription du gène situé en aval de la « Fur box ». Dans le cas de *P. aeruginosa*, la forme apo- est tétramérique et la dissociation du tétramère est nécessaire pour générer les dimères capables d'interagir au niveau des sites de liaison à l'ADN (Figure 13) (Pérard *et al.*, 2016). Lorsque la concentration intracellulaire en fer diminue, le fer se dissocie de Fur qui est alors retrouvé en conformation dite « ouverte », ne permettant plus sa liaison à l'ADN (Figure 13) (Steingard and Helmann, 2023).



**Figure 13 :** Mécanisme de régulation médié par Fur chez *P. aeruginosa*. En condition de carence en fer, Fur est présent sous forme de tétramère inactif (PDB 6H1C) (Pérard *et al.*, 2016) conduisant à l'activation de la transcription des gènes sous la régulation de Fur. Lorsque le fer est présent en quantité suffisante, le tétramère se dissocie pour former deux dimères actifs (PDB 1M2B) (Pohl *et al.*, 2003) qui vont pouvoir se lier de part et d'autre de la « Fur box » et inhiber la transcription des gènes sous la régulation de Fur.

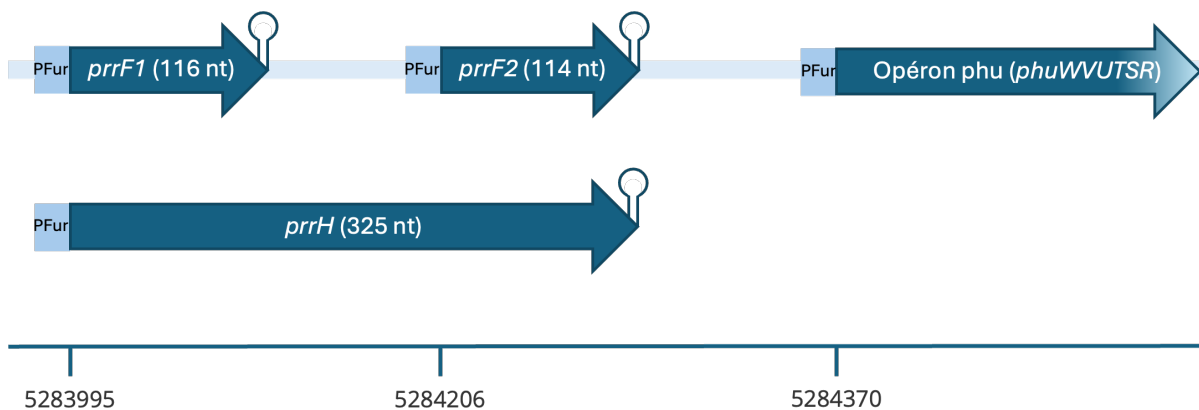
Outre son rôle dans l'homéostasie du fer, des études omiques récentes ont permis de révéler que Fur est un régulateur central du métabolisme bactérien. Fur contrôle en effet directement ou indirectement l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme central, la virulence, la respiration ou encore le stress oxydatif chez les bactéries (Escolar *et al.*, 1999; Ochsner *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2003; Wilderman *et al.*, 2004). Fur active également indirectement l'expression de gènes *via* la répression de petits ARN (sRNA) ou encore en réprimant l'expression d'activateurs transcriptionnels comme les facteurs sigma ou les facteurs de transcription (Ochsner *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2003). Dans le cas de *P. aeruginosa*, Fur contrôle l'expression de PvdS, un facteur sigma régulant la voie de biosynthèse du sidérophore PVD, mais qui est également impliqué dans la



régulation de facteurs de virulence comme l'exotoxine A, témoignant du rôle global de Fur sur le fitness bactérien (Llamas *et al.*, 2014). Cette régulation indirecte permet, en plus d'une régulation en réponse à la quantité intracellulaire en fer, de répondre aux stimuli de l'environnement (Sánchez-Jiménez, Marcos-Torres, *et al.*, 2023).

#### 4.1.2 Les régulateurs post-transcriptionnels, les sRNA

Les petits ARN régulateurs (sRNA) sont des ARNs non traduits de 50 à 250 nucléotides impliqués dans la régulation de la traduction et la stabilité des ARN messagers (ARNm). Ils possèdent une séquence d'appariement aux ARNm cibles, un site de liaison aux chaperonnes, et un terminateur indépendant de Rho assurant leur stabilité (Papenfort and Melamed, 2023). Leur principal mode d'action est la répression de la traduction en bloquant le site de liaison des ribosomes (RBS) des ARNm cibles (Kavita *et al.*, 2018). Toutefois, certains sRNA peuvent aussi activer la traduction par libération du RBS (Wagner and Romby, 2015) ou induire la dégradation des ARNm en recrutant des ribonucléases (Bandyra *et al.*, 2012).



**Figure 14 :** Organisation du locus *prrF* chez *P. aeruginosa* PAO<sub>1</sub>. La transcription simultanée de *prrF1* et *prrF2* par contournement du terminateur Rho-indépendant de *PrrF1* permet la transcription d'un plus long sRNA, *prrH*. Le locus *prrF* est situé en amont de l'opéron *phu*, impliqué dans l'acquisition de l'hème chez *P. aeruginosa*.

Chez les bactéries à Gram négatif, la régulation des sRNA est facilitée par des chaperonnes Hfq et ProQ, qui stabilisent ces ARN en empêchant leur dégradation et qui contrôlent directement la traduction de certains ARNm cibles, comme observé chez *P. putida* dans la régulation de la biosynthèse et l'import des sidérophores (Sánchez-Hevia *et al.*, 2018; Papenfort and Melamed, 2023). L'homéostasie du fer est régulée post-transcriptionnellement par des sRNA sous la régulation de Fur. Chez *P. aeruginosa*, les sRNA *PrrF1* et *PrrF2* répriment la traduction de gènes impliqués dans le

stockage du fer, la résistance au stress oxydatif et la virulence bactérienne (Wilderman *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2024). La transcription en tandem de *prfF1* et *prfF2* conduit à la formation de PrrH, impliqué dans la régulation de la biosynthèse de la PVD et de l'hème *via* PhuS (Figure 14) (Oglesby-Sherrouse and Vasil, 2010; Wilson *et al.*, 2021). Récemment, des approches omiques ont mis en évidence que PrrH régulerait également la biosynthèse de la PCH *via* *pchE* (Hoang *et al.*, 2023). Des analogues ont également été identifiés dans diverses bactéries comme RhyB chez *E. coli*, avec des fonctions similaires (Papenfort and Melamed, 2023).

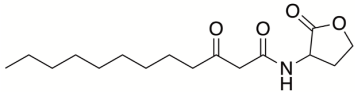
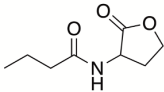
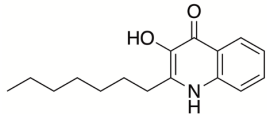
### 4.1.3 Le quorum sensing (QS)

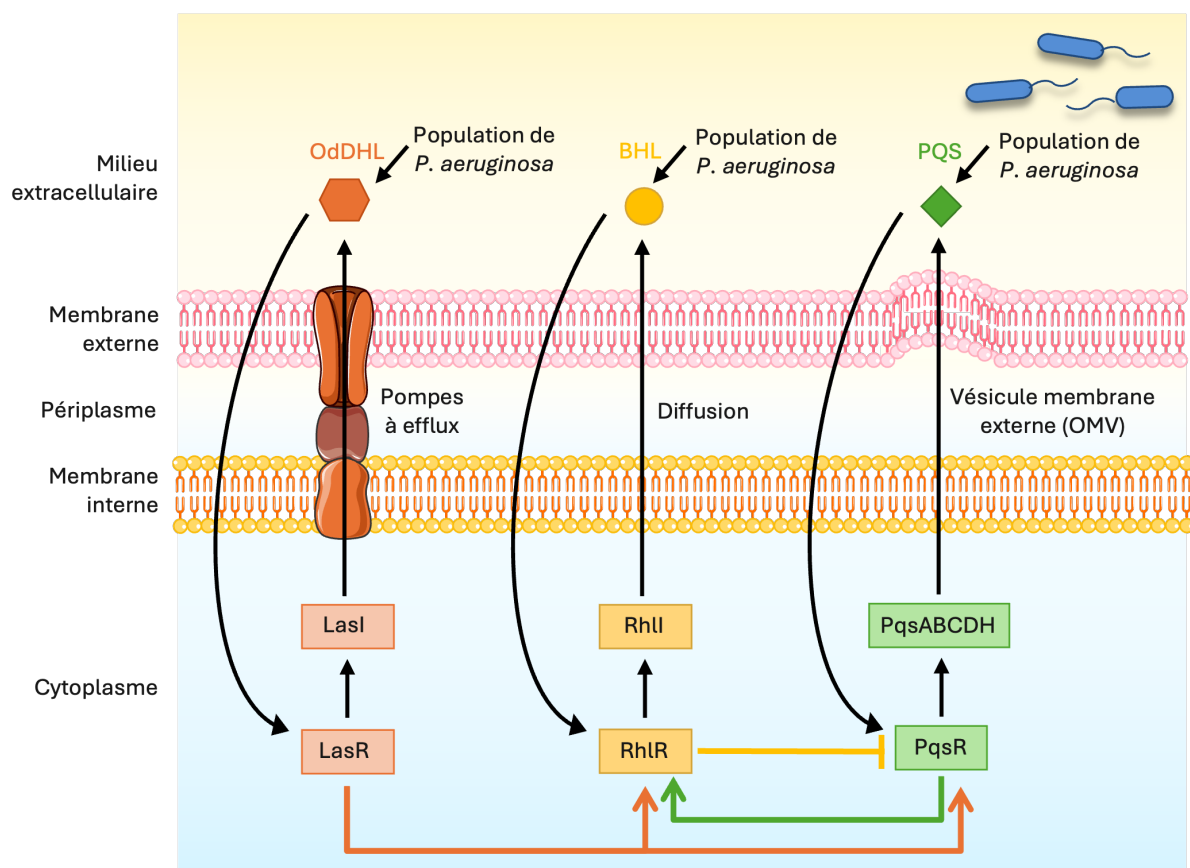
Le quorum sensing (QS) est un mécanisme global de régulation bactérienne, permettant une réponse coordonnée en fonction de la densité cellulaire (Strateva and Mitov, 2011). Il repose sur la production, la détection et l'accumulation cytoplasmique d'auto-inducteurs (AI) qui, à une concentration seuil, activent les régulateurs transcriptionnels associés, contrôlant la transcription de gènes impliqués dans la formation du biofilm (rhamnolipides, Pel, lectines), la virulence (protéases, hémolysines, exotoxine A, pyocyanine), la réponse au stress oxydatif ou encore le métabolisme du fer (Lee *et al.*, 2009; Lee and Zhang, 2015).

Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes QS hiérarchisés coexistent : Las, Rhl et Pqs (Pseudomonas quinolone system). Las, en tête de cascade, détecte l'AI N-(3-oxododécanoyl) homosérine lactone (ODDHL) *via* le régulateur LasR, activant ainsi les systèmes Rhl et Pqs, mais aussi plus de 300 gènes impliqués dans la virulence et la formation de biofilm (Rutherford and Bassler, 2012; Lee *et al.*, 2015). Le système Rhl va à son tour détecter le N-butanoyl-L-homosérine lactone (BHL) *via* son régulateur RhlR, qui va également réguler la biosynthèse des rhamnolipides, agissant ainsi en synergie avec LasR pour répondre à la densité cellulaire au cours de la phase exponentielle de croissance (Figure 15) (Oglesby *et al.*, 2008; Sánchez-Jiménez, Llamas, *et al.*, 2023).

Enfin, le système Pqs, activé en fin de phase exponentielle, est particulièrement sensible aux conditions de carence en fer (Oglesby *et al.*, 2008). Il repose sur la détection du PQS par le régulateur PqsR, qui induit l'expression des gènes de la biosynthèse du PQS (*pqsABCDH*), ainsi que des gènes du système Rhl, établissant une boucle de rétro-régulation où RhlR peut inhiber l'expression de Pqs (Figure 15). Le système Pqs joue un rôle central dans l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa*, en

contrôlant directement la biosynthèse des sidérophores endogènes et PCH (*pvdA*, *pvdD* et *pvdJ* pour la PVD et *pchABCD* et *fptA* pour la PCH) et indirectement, *via* l'activation des régulateurs spécifiques *pvdS* et *pchR* (Rutherford and Bassler, 2012; Rampioni *et al.*, 2016). Ainsi, les trois système QS orchestrent la régulation d'un dixième du génome de *P. aeruginosa*, influençant son adaptation et sa pathogénicité (García-Reyes *et al.*, 2020).

Systeme	Las	Rhl	PQS
Stimuli	Densité cellulaire, hypoxie, stress oxydatif	Système immunitaire, stress oxydatif	Carence en fer
Auto-inducteur (AI)	OdDHL	BHL	PQS
			



**Figure 15 :** Réseau croisé du quorum sensing (QS) chez *P. aeruginosa* composé des systèmes Las, Rhl et PQS. Trois auto-inductrices synthèses (LasI, RhlI et PqsABCDH) produisent respectivement les auto-inducteurs (AI) OdDHL, BHL et PQS en réponse à la densité de la population bactérienne. Ces AI vont alors lier le facteur de transcription associé (respectivement LasR, RhlR et PqsR) conduisant à leur propre activation mais aussi à la régulation croisée des différents systèmes (flèches en couleur).

## 4.1.1 Autres régulateurs impliqués dans l'homéostasie du fer

### 4.1.1.1 Le système Gac/ Rsm

Le réseau de signalisation Gac/Rsm joue un rôle majeur dans l'instauration d'une infection chronique en induisant la transition d'un mode de vie planctonique à celui de biofilm en réponse aux stimuli environnementaux et à la densité bactérienne. Son fonctionnement chez *P. aeruginosa* est basé sur un système à deux composants, GacAS, dont l'activité est dépendante de deux senseurs kinases présents dans la membrane interne, LadS et RetS (Ventre *et al.*, 2006). Lorsque GacA est activé, il active la transcription de deux sRNA, RsmY et RsmZ (Brencic *et al.*, 2009) qui vont interagir avec la protéine de liaison à l'ARN, RsmA permettant l'interaction et la régulation de la traduction des ARNm cibles (Kay *et al.*, 2006). RsmA est également impliqué dans la régulation de la biosynthèse et l'acquisition des sidérophores endogènes (PVD et PCH) en contrôlant l'expression de *pvdS* et de *pchR* (Frangipani *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2020). De plus, il a été récemment décrit que les deux sRNAs, RsmY et RsmZ, sont régulés par la carence en fer en condition de culture statique, témoignant de l'importance du fer dans le processus de formation du biofilm (Chourashi and Oglesby, 2024). Le système Gac/Rsm repose donc sur une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes, témoignant de l'imbrication des différents systèmes de régulation permettant une régulation fine du fitness bactérien en réponse à son environnement.

### 4.1.1.2 AmpR

AmpR est un régulateur transcriptionnel global intervenant dans l'homéostasie du fer et la réponse au stress chez *P. aeruginosa*. Il contrôle la transcription de plus de 500 gènes, dont l'activation de la transcription de l'hémophore HasAP, de gènes impliqués dans la biosynthèse des sidérophores endogènes (PVD et PCH) et de l'ARN régulateur anti-sens asPrrF1. Ce dernier inhibe l'action de PrrF1, favorisant ainsi l'activation des voies d'acquisition du fer (Balasubramanian *et al.*, 2014). AmpR contribue également à la résistance au stress oxydatif, à la virulence bactérienne ainsi qu'à la résistance aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames.

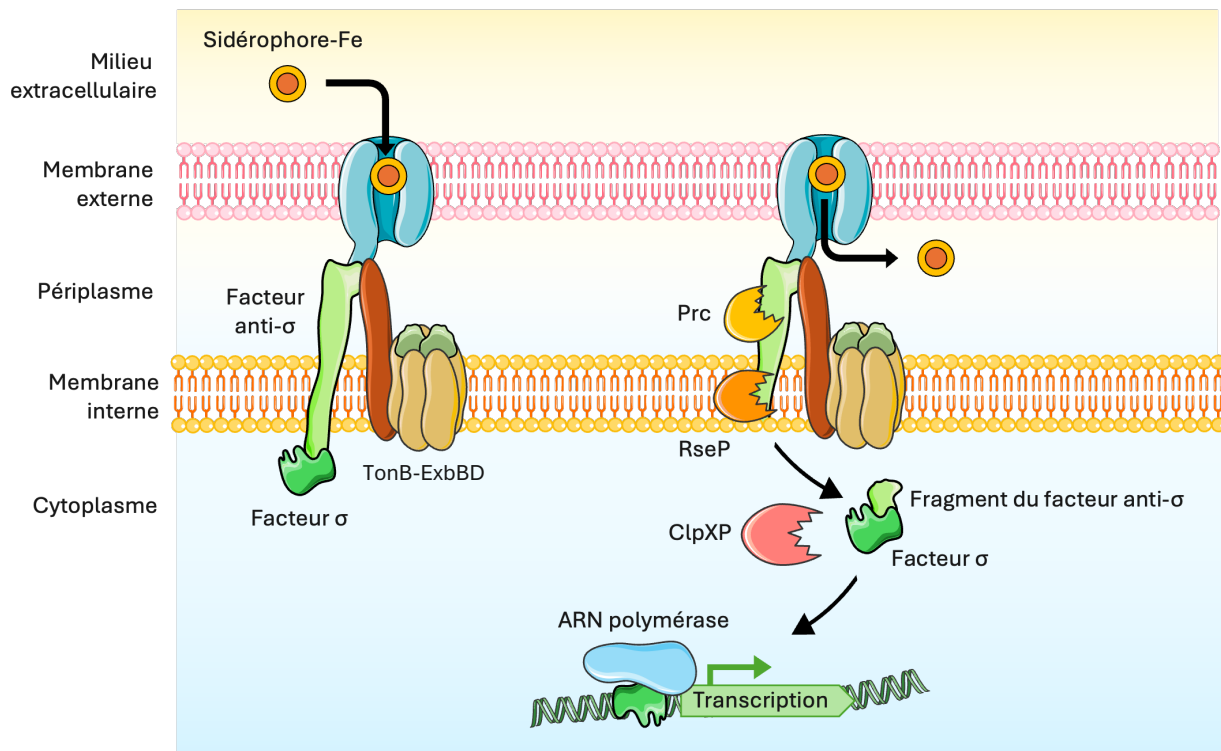
## 4.2 Régulateurs spécifiques des voies d'import du fer

La fonction de Fur est de réprimer la transcription des gènes impliqués dans l'import du fer lorsque suffisamment de fer a été importé dans les cellules bactériennes. En carence en fer, la répression de Fur est levée et la transcription de certains gènes impliqués dans l'import du fer peut alors également être activée par des mécanismes impliquant des ECF-sigma, des systèmes à deux composants, des systèmes de la famille AraC ou IclR.

### 4.2.1 Les ECF-sigma

Les facteurs extracytoplasmiques (ECF) sigma font partie du groupe le plus vaste et le plus diversifié des régulateurs transcriptionnels de la famille des  $\sigma^{70}$ . Ils sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes en réponse à des stimuli environnementaux comme la présence de sidérophores ou le stress oxydatif (Helmann, 2002).

Les ECF sigma se distinguent des facteurs sigma classiques par leur co-transcription avec un inhibiteur associé, appelé facteur anti-sigma, qui permet de moduler leur action en fonction des stimuli environnementaux. Leur fonctionnement est en effet dépendant du système de signalisation de surface cellulaire (CSS) qui s'étend de la membrane externe au cytoplasme et permet ainsi aux bactéries à Gram négatif de transduire un stimulus extracellulaire jusqu'au cytoplasme et permettre ainsi une réponse transcriptionnelle appropriée. Le système CSS est un système tripartite qui se compose d'un TBDT localisé dans la membrane externe, d'un facteur anti-sigma ancré à la membrane cytoplasmique et d'au moins un facteur extracytoplasmique (ECF) sigma. Seuls les TBDTs possédant un domaine de signalisation (SD) en N terminal peuvent jouer le rôle de transducteur dans ce type de signal (Llamas *et al.*, 2014).



**Figure 16 :** Fonctionnement du système sigma/anti-sigma où le facteur anti-sigma subit une protéolyse intermembranaire régulée (RIP), permettant le relargage du facteur sigma dans le cytoplasme et sa liaison à sa cible.

En absence de signal, le facteur anti-sigma inhibe l'ECF sigma. La détection d'un complexe ferri-sidérophore par le TBDT induit une interaction avec le facteur anti-sigma *via* le domaine SD du TBDT, déclenchant la dégradation du facteur anti-sigma par une cascade protéolytique impliquant les protéases membranaires PrC, RseP et la protéase cytoplasmique ClpX, permettant de libérer l'ECF sigma dans le cytoplasme bactérien (Braun *et al.*, 2022). L'ECF sigma va alors activer la transcription des gènes impliqués dans l'import du sidérophore (Figure 16) (Llamas *et al.*, 2014; Wettstadt *et al.*, 2024). Des données récentes ont révélé chez *P. aeruginosa*, une interaction entre le SD et le facteur anti-sigma FoxR en absence de signal, inhibant la protéolyse de FoxR et suggérant un contrôle supplémentaire du système CSS (Wettstadt *et al.*, 2024).

*P. aeruginosa* se distingue des autres bactéries à Gram négatif par la présence dans son génome de nombreux facteurs sigma (24) impliqués dans la virulence, le stress oxydatif, la formation de biofilm, dont 19 ECF-sigma. Parmi ces 19 ECF sigma, 13 régulent la transcription de TBDTs, dont 8 sont spécifiquement impliqués dans l'acquisition du fer (Tableau 4) (Potvin *et al.*, 2008). Les ECF sigma/anti-sigma associés sont systématiquement codés au sein d'un même opéron et situés en amont du gène du TBDT cible.

**Tableau 4 :** Liste des facteurs extracytoplasmiques (ECF) sigma et anti-sigma chez *P. aeruginosa* PAO1 et leur transporteur TonB-dépendant (TBDT) cible.

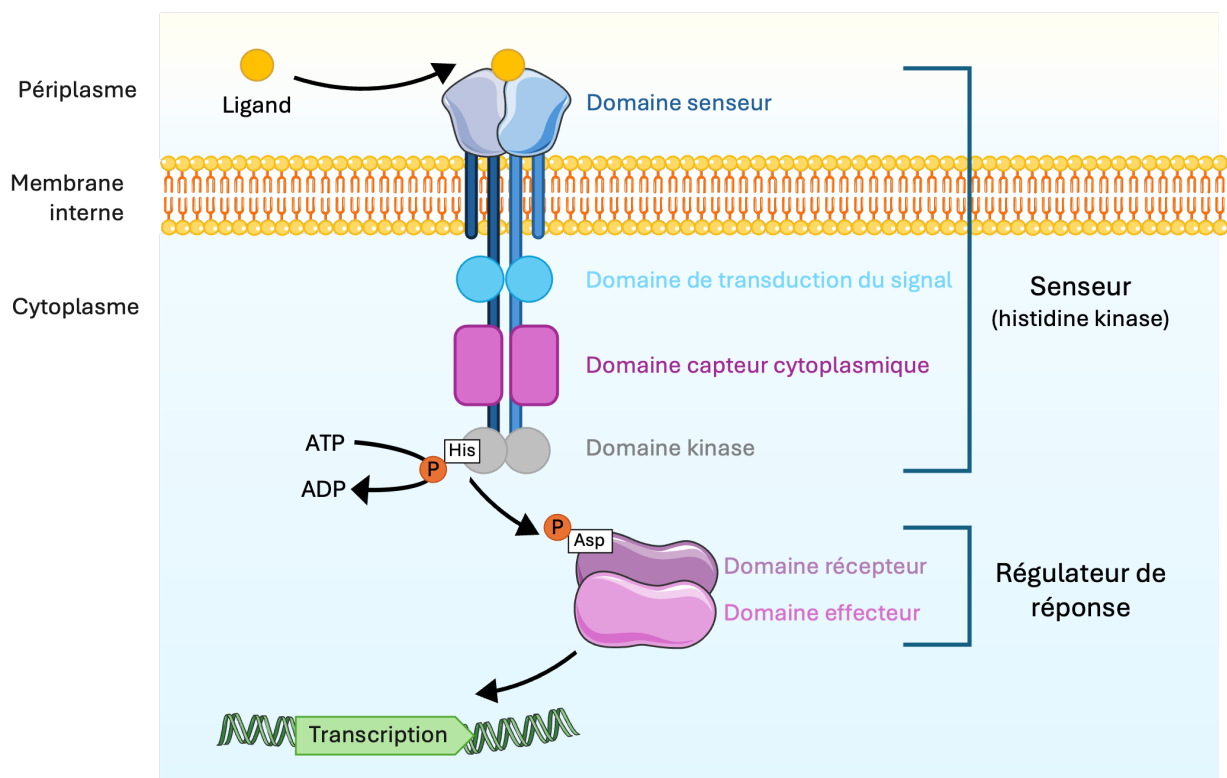
Facteur sigma		Facteur anti-sigma		Transporteur (TBDT)		Références
Gène	Nom	Gène	Nom	Gène	Nom	
PA0149	-	PA0150	-	PA0151	-	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
PA0472	FiuI	PA0471	FiuR	PA0470	FiuA	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
PA1300	HxuI	PA1301	HxuR	PA1302	HxuA	(Otero-Asman <i>et al.</i> , 2019)
PA1363	-	PA1364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

#### 4.2.2 Le système à deux composants (TCS)

Le système à deux composants (TCS) constitue, avec les facteurs sigma, les principales voies de régulation chez les bactéries, permettant de répondre aux stimuli environnementaux. Le TCS se compose de deux protéines, un senseur, qui est une histidine kinase ancrée dans la membrane interne, et un régulateur de réponse cytoplasmique.

Les histidines kinases possèdent généralement deux domaines : un domaine transmembranaire qui permet de détecter les stimuli environnementaux, et un domaine kinase cytoplasmique, hautement conservé, qui permet de déclencher la cascade de phosphorylation. La détection d'un signal induit l'autophosphorylation de la kinase sur un résidu His, suivi d'un transfert du phosphate au régulateur, activé par phosphorylation sur un résidu Asp (Rodrigue *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 2000). En fonction de sa cible, le régulateur de réponse peut agir comme activateur ou comme répresseur transcriptionnel par son domaine C-terminal variable de liaison à l'ADN (Figure 17). La cascade de phosphorylation assure une régulation précise de la voie en empêchant les interactions aspécifiques. Chez *P. aeruginosa*, on retrouve deux systèmes à deux composants, Pfs/PfeR et PirS/PirR, impliqués dans la régulation de l'acquisition du fer par les sidérophores de type catéchol. Les gènes codant ces

deux systèmes sont, comme pour les facteurs sigma, disposés en tandem dans le génome en amont du gène codant le TBDT associé dont ils assurent la régulation (Stover *et al.*, 2000). L'activation de ces systèmes passe par l'import du complexe ferri-sidérophore dans le périplasma *via* le TBDT associé, et sa liaison au senseur permet alors l'activation transcriptionnelle de la voie (Gasser *et al.*, 2021). D'autres TCS participent également à l'homéostasie du fer : BqsSR induit l'expression de facteurs de virulence et de réductases en réponse au fer ferreux extracellulaire (Sánchez-Jiménez, Marcos-Torres, *et al.*, 2023), tandis qu'AlgZR contrôle plusieurs gènes liés à la virulence et au métabolisme du fer, soulignant le lien étroit entre acquisition du fer et pathogénicité (Little *et al.*, 2018).



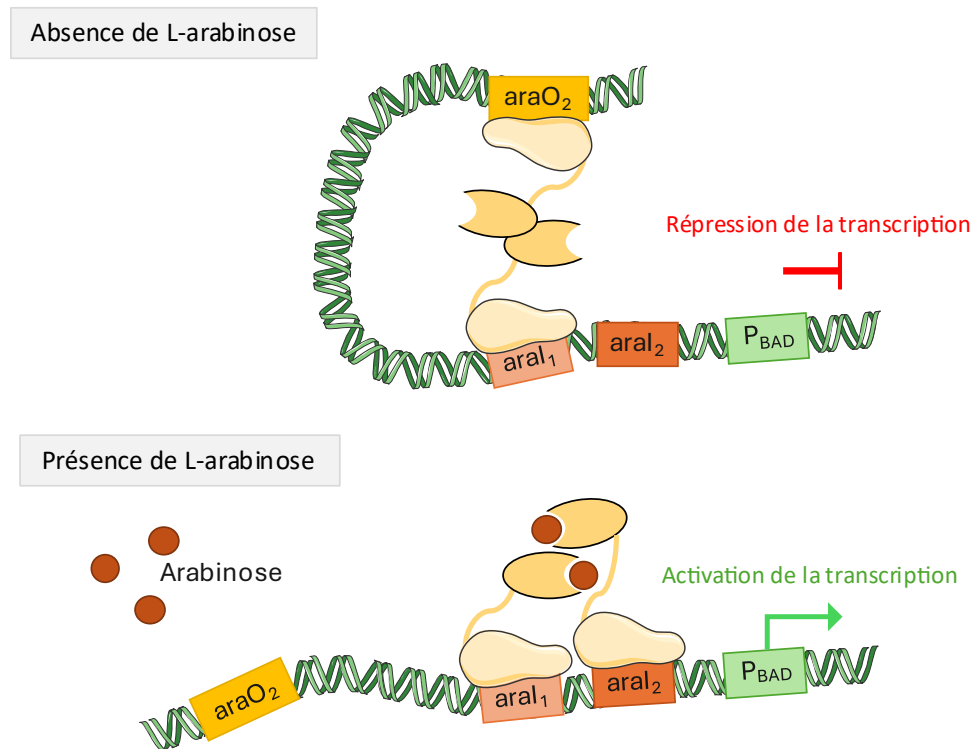
**Figure 17 :** Fonctionnement du système à deux composants . Le senseur détecte le stimulus environnemental (ligand) par le biais du domaine senseur, conduisant à la phosphorylation du résidu histidine (His). Le groupe phosphate est transféré au résidu aspartate (Asp) du régulateur de réponse, conduisant à sa liaison à l'ADN cible et à sa régulation.

#### 4.2.3 Les régulateurs de la famille des AraC

La famille AraC est une famille de régulateurs transcriptionnels cytosoliques qui appartient au plus grand système de régulation chez les bactéries, les systèmes à un composant (One component system, OCS). Ces systèmes se composent d'un domaine N-terminal variable impliqué dans la



reconnaissance du signal et la dimérisation, et un domaine C-terminal en hélice-tour-hélice (HTH) hautement conservé de liaison à l'ADN permettant la régulation de la transcription (Ulrich *et al.*, 2005). Les systèmes à un composant impliquent que les molécules effectrices puissent traverser les membranes plasmiques bactériennes (Ulrich *et al.*, 2005). Généralement, la reconnaissance d'un effecteur au niveau du domaine N-terminal conduit à un changement conformationnel du régulateur, qui expose alors son domaine HTH, permettant sa liaison à l'ADN (Cashin *et al.*, 2006).



**Figure 18 :** Fonctionnement du système AraCpBAD chez *E. coli*. En absence d'arabinose, le régulateur AraC (en jaune) se lie aux sites distants O<sub>2</sub> et I<sub>1</sub> conduisant à la répression transcriptionnelle de l'opéron BAD par repliement de l'ADN. En présence de l'effecteur arabinose (en marron), AraC se lie alors aux sites adjacents I<sub>1</sub> et I<sub>2</sub>, libérant la boucle d'ADN qui rend alors possible le recrutement de l'ARN polymérase permettant la transcription de l'opéron.

Les régulateurs transcriptionnels AraC sont impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires chez les bactéries dont la régulation du métabolisme du carbone, de la virulence ou encore de la réponse au stress oxydatif (Yang *et al.*, 2011). L'OCS le mieux caractérisé est le régulateur AraC chez *E. coli*, impliqué dans le métabolisme du pentose phosphate. En absence de L-arabinose, AraC adopte une conformation inactive, repliant l'ADN et bloquant la transcription de l'opéron araBAD. Sa liaison au L-arabinose induit une modification allostérique qui lui permet de se fixer à

des sites adjacents, dépliant l'ADN et permettant la transcription de l'opéron *araBAD* (Figure 18) (Fernandez-López *et al.*, 2015).

Les régulateurs transcriptionnels AraC peuvent également être impliqués dans l'acquisition du fer comme c'est le cas de PchR chez *P. aeruginosa*. Son activation implique la présence du complexe ferri-PCH dans le cytoplasme, qui va jouer le rôle d'effecteur. La liaison du complexe ferri-PCH à PchR déclenche alors un changement de conformation, permettant l'interaction du domaine HTH du régulateur avec la PchR box et l'activation des gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport de la PCH (Michel *et al.*, 2005; Cunrath *et al.*, 2020).

#### 4.2.4 Les régulateurs de type IclR

Les régulateurs IclR (pour **R**égulateur **I**so**c**itrate **L**yase) sont des facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme du glyoxylate, la dégradation des hydrocarbures ou encore la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. Il s'agit de systèmes à un composant (OCS) de même organisation et principe fonctionnel que les régulateurs de la famille AraC. Leur différence repose sur leur rôle bivalent dans la régulation des voies métaboliques où un même régulateur peut à la fois activer et réprimer la transcription de gènes spécifiques en réponse à un stimulus (Molina-Henares *et al.*, 2006). Le seul exemple de régulateur IclR impliqué dans l'homéostasie du fer est le régulateur FvbR chez *P. aeruginosa* qui serait impliqué dans la régulation de la voie vibriobactine chez *P. aeruginosa* en agissant, en absence d'effecteur, comme répresseur transcriptionnel du gène codant le TBDT FvbA (Elias *et al.*, 2011).

Chapitre IV : Acquisition du fer chez  
*Pseudomonas aeruginosa*



## 1 Les transporteurs TonB-dépendants chez *P. aeruginosa*

Le génome de *P. aeruginosa* contient 35 gènes codant pour des TBDTs, dont certains n'ont été que prédits *in silico*, sur la base de la présence d'une structure en tonneau  $\beta$  et d'un domaine N-terminal en bouchon ou domaine « plug » (Tableau 5). Parmi ces 35 TBDTs, 15 sont sous la régulation de Fur, le régulateur transcriptionnel majeur impliqué dans l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa* (Tableau 5, en orange), démontrant ainsi l'implication de ces transporteurs dans l'acquisition du fer. 3 de ces TBDTs sont impliqués dans l'import du fer par les sidérophores endogènes PVD et PCH et 9 de ces TBDTs sont impliqués dans l'acquisition du fer *via* des xénosidérophores, permettant à la bactérie d'utiliser une grande variété de ligands issus de son environnement. Enfin, 3 TBDTs sont impliqués dans l'import de l'hème (Tableau 5).

D'autres TBDTs (au nombre de 6) sont également impliqués dans l'homéostasie des métaux chez *P. aeruginosa*, avec 4 pour le zinc (Tableau 5, en gris), 1 pour le cuivre (Tableau 5, en bleu) et 1 pour le cobalt (Tableau 5, en vert). Les TBDTs peuvent également être la porte d'entrée pour d'autres molécules comme des sucres (Neugebauer *et al.*, 2005), des bactériophages (Rabsch *et al.*, 2007) ou des bactériocines nucléases comme les pyocines S5 (Grass *et al.*, 2005; Behrens *et al.*, 2020).

## 2 Les voies d'import du fer chez *P. aeruginosa*

Au cours de son évolution, *P. aeruginosa* a acquis une grande capacité d'adaptation lui permettant de coloniser une grande diversité de biotopes. Ceci repose sur son incroyable capacité à acquérir le fer en produisant des sidérophores, tout en exploitant ceux produits par d'autres organismes dans une stratégie de piratage des sidérophores. Toutes ces voies sont finement régulées ce qui lui permet de s'ajuster aux variations environnementales, lui conférant un avantage sélectif non négligeable dans la colonisation des diverses niches écologiques.

Notre laboratoire s'intéresse depuis plus de 25 ans aux mécanismes moléculaires impliqués dans ces différentes voies et une très grande fraction des connaissances concernant ces différentes voies ont été produites par notre équipe. Dans la suite de cette introduction, les voies d'acquisition du fer seront présentées et décrites telles qu'elles étaient connues lorsque j'ai démarré ma thèse.

**Tableau 5 :** Liste des TBDTs présents dans le génome de *P. aeruginosa* PAO1. La transcription de certains TBDTs est régulée en bleu, par des ECF sigma/anti-sigma ; en jaune, par des systèmes à deux composants ; en vert, par des régulateurs AraC ou en orange, par des régulateurs de type IclR. La première colonne indique également le rôle de certains TBDTs dans l'homéostasie des métaux (le fer en orange ; le zinc en gris ; le cuivre en bleu et le cobalt en vert).

Gène	Nom	Ligand (L)	Référence	Statut
PA0151	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA0192	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA0434	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA0470	FiuA	Ferrichrome	(Llamas <i>et al.</i> , 2006; Hannauer <i>et al.</i> , 2010)	
PA0781	ZnuD	Zn <sup>2+</sup>	(Pederick <i>et al.</i> , 2015)	
PA0931	PirA	Entérobactine, Monocatéchols	(Ghysels <i>et al.</i> , 2005; Moynié <i>et al.</i> , 2017)	
PA1271	BtuB	Cobalamine	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA1302	HxuA	Hème	(Luzar and Montie, 1985; Cornelis and Bodilis, 2009; Konings <i>et al.</i> , 2013)	
PA1322	PfuA		(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA1365	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA1613	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA1910	FemA	Mycobactine, Carboxymycobactine	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)	
PA1922	CirA	Zn	(Pederick <i>et al.</i> , 2015)	
PA2057	SppR		(Pletzer <i>et al.</i> , 2016)	
PA2070	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2089	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2289	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2335	OptO		(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2398	FpvA	Pyoverdine	(Poole <i>et al.</i> , 1991)	
PA2466	FoxA	Ferrioxamine B, Nocardamine		
PA2590	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2688	PfeA	Entérobactine	(Poole <i>et al.</i> , 1990)	
PA2911		Zn	(Pederick <i>et al.</i> , 2015)	
PA3268	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA3408	HasR	HasAP-hème	(Smith and Wilks, 2015)	
PA3790	OprC	Cuivre	(Bhamidimarri <i>et al.</i> , 2021)	
PA3901	FecA	Citrate	(Marshall <i>et al.</i> , 2008)	
PA4156	FvbA	Vibriobactine	(Elias <i>et al.</i> , 2011)	
PA4168	FpvB	Pyoverdine, Desferrioxamine B, Ferrichrome	(Ghysels <i>et al.</i> , 2004; Chan and Burrows, 2022)	
PA4221	FptA	Pyochéline, Cépabactine	(Ankenbauer and Quan, 1994)	
PA4514	PiuA	Monocatéchols	(Moynié <i>et al.</i> , 2017)	
PA4675	ChtA	Aérobactine, rhizobactine, schizokinen	(Cuív <i>et al.</i> , 2006)	
PA4710	PhuR	Hème	(Smith and Wilks, 2015)	
PA4837	CntO	Pseudopaline (Zn)	(Lhospice <i>et al.</i> , 2017)	
PA4897	OptI		(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit

## 2.1 Voies d'import du fer par les endosidérophores

### 2.1.1 La voie pyoverdine (PVD)

#### 2.1.1.1 Biosynthèse et sécrétion de la PVD

La pyoverdine (PVD), connue d'abord sous le nom « pseudobactine » ou « fluorescéine », est l'un des deux sidérophores produit par *P. aeruginosa*. Il a été découvert en 1892 mais sa fonction dans l'import du fer n'a été établie qu'à la fin des années 70 par Meyer et Abdallah (Meyer and Abdallah, 1978). Aujourd'hui, près de 100 pyoverdines ont été décrites, provenant des diverses souches et espèces de *Pseudomonas* (Schalk and Guillon, 2013). Les pyoverdines constituent en effet le principal système d'acquisition du fer chez les *Pseudomonas* fluorescents. Elles possèdent toutes un chromophore caractéristique, dérivé de la 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline, lié à un groupement acyl et à une chaîne peptidique de séquence et de taille variables selon les PVDs (de 6 à 12 acides aminés) (Schalk *et al.*, 2020). Le chromophore confère à la molécule ses propriétés spectrales, lui donnant une couleur jaune-vert caractéristique. Chez *P. aeruginosa*, quatre types distincts de pyoverdines sont produits : PVDI, PVDII, PVDIII et PVDIV, qui se différencient par la composition de leur chaîne peptidique. Chacune des pyoverdines peut être trouvée avec une chaîne latérale de type succinamide, succinique ou alpha-cétoglutarique. La souche de référence PAO1, couramment utilisée au laboratoire, synthétise la PVDI, nommée PVD dans ce manuscrit (Figure 19) (Meyer *et al.*, 1997).

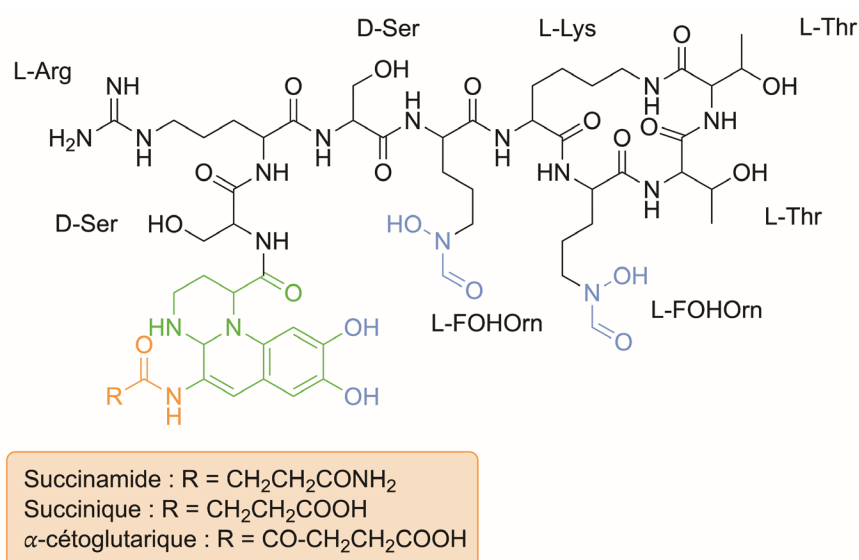


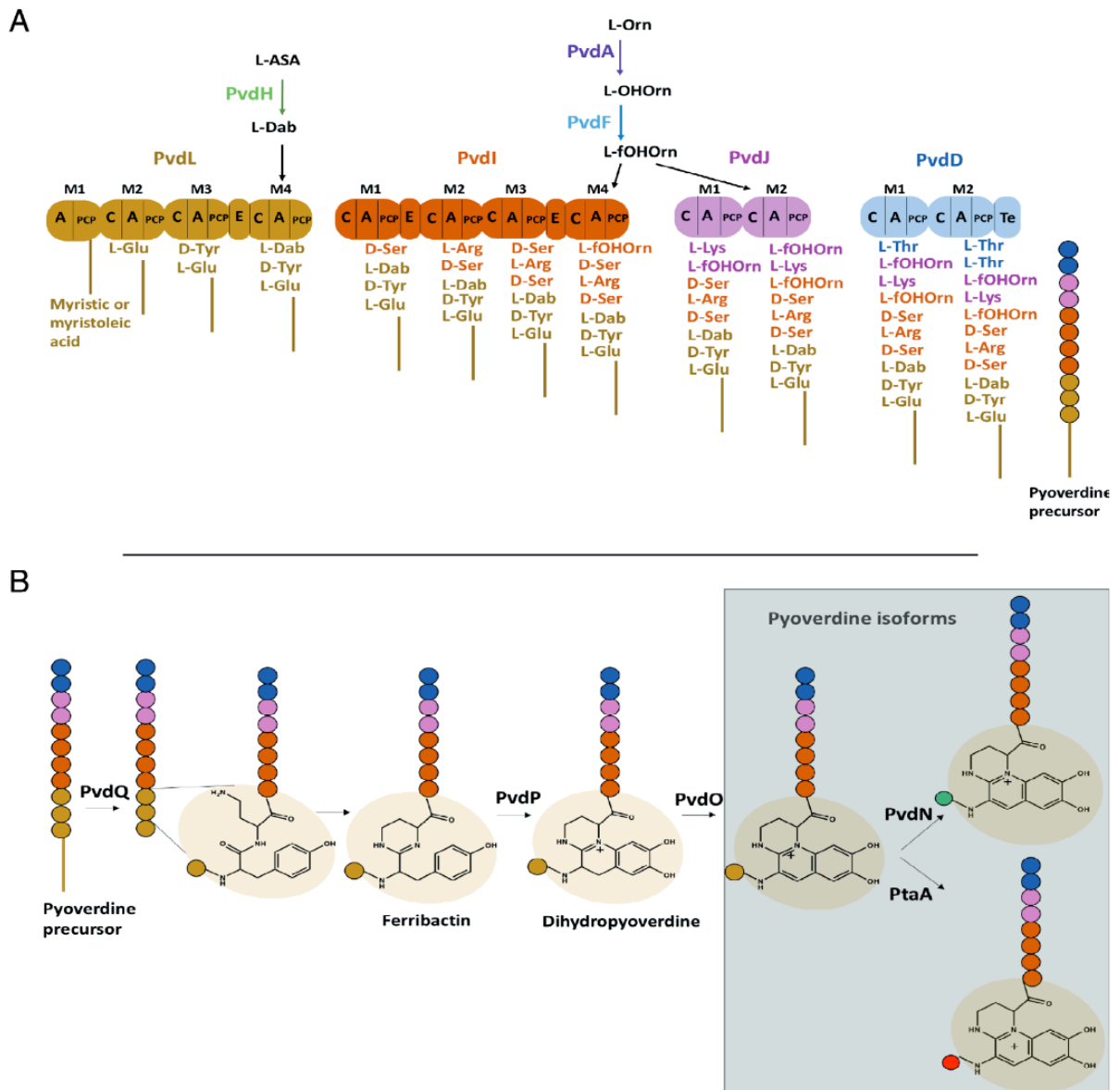
Figure 19 : Structure chimique de la PVDI produite par *P. aeruginosa* PAO1. La chaîne latérale variable est représentée en orange, le chromophore en vert, la chaîne peptidique en noir et les groupements chélateurs du Fe<sup>3+</sup> en bleu.

La biosynthèse des pyoverdines débute dans le cytoplasme et se termine dans le périplasme, d'où elle sera sécrétée dans le milieu extracellulaire. Cette synthèse implique de nombreuses enzymes, dont des peptides synthétases non-ribosomales (NRPS). Il s'agit de larges enzymes à architecture multimodale où chaque module catalyse l'incorporation d'un acide aminé spécifique pour former en plusieurs étapes la partie peptidique et le squelette du chromophore.

Chaque module se compose de 3 domaines : un domaine d'adénylation (A) qui reconnaît un acide aminé spécifique et qui l'active par une adénylation ATP-dépendante, un domaine de condensation (C) qui forme la liaison peptidique entre les deux acides aminés, et un domaine terminal qui est une protéine porteuse de peptide (PCP). Certains NRPS, comme PvdL et PvdI, possèdent également un domaine d'épimérisation (E) jouant un rôle clé dans la stéréospécificité des acides aminés incorporés dans la chaîne peptidique (Figure 20A). Le dernier NRPS contient également un domaine thioestérase (TE) qui catalyse l'hydrolyse de la chaîne peptidique permettant son relargage du NRPS (Izoré and Cryle, 2018). La différence de biosynthèse des pyoverdines se situe principalement au niveau des NRPS impliqués dans l'assemblage du peptide, permettant l'incorporation des séquences spécifiques à chaque pyoverdine. Les enzymes additionnelles vont, quant à elles, permettre l'incorporation d'acides aminés atypiques (Schalk and Guillon, 2013).

Chez *P. aeruginosa* PAO<sub>1</sub>, la biosynthèse de la PVD prend place dans un complexe enzymatique cytoplasmique, appelé sidérosome, qui serait constitué de toutes les NRPS impliquées dans la biosynthèse du précurseur de la PVD (Guillon *et al.*, 2012; Imperi and Visca, 2013). Son rôle est de coordonner l'assemblage modulaire du squelette peptidique de la PVD par l'incorporation séquentielle d'acides aminés. Contrairement aux autres NRPS, PvdL est principalement localisé dans la membrane interne, bien qu'il co-localise avec les autres enzymes, soulignant son rôle central dans l'orchestration de cette voie de biosynthèse et sa fonction régulatrice essentielle (Manko *et al.*, 2024).





**Figure 20 :** Voie de biosynthèse de la PVD chez *P. aeruginosa* PAO<sub>1</sub> (Schalk *et al.*, 2020). **A.** Synthèse du précurseur de la PVD dans le cytoplasme par quatre NRPS multimodaux (PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD). Le précurseur final est relargué du NRPS par le domaine thioestérase (TE) présent sur PvdD. **B.** Maturation du précurseur dans le périplasma en isoformes de la PVD. Après le passage vers le périplasma via PvdE, la maturation du précurseur implique cinq enzymes (PvdQ, PvdP, PvdO, PvdN et PtaA). Les cercles verts et rouges sur les isoformes de la PVD correspondent respectivement à l'acide succinique et l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique.

La biosynthèse débute avec PvdL, possédant un premier module atypique, M1. Il s'agit d'une acyl-coenzyme A ligase, catalysant l'acylation de l'acide myristique ou myristoléique, ancrant ainsi le précurseur à la membrane interne (Hannauer *et al.*, 2012). Les modules M2, M3 et M4 de PvdL assurent ensuite l'incorporation des trois acides aminés formant le squelette du chromophore (L-Glu, D-Tyr et L-Dab). L'élongation du peptide précurseur est ensuite assurée par PvdI et PvdJ, qui ajoutent divers acides aminés, dont des acides aminés atypiques, au peptide précurseur (Figure

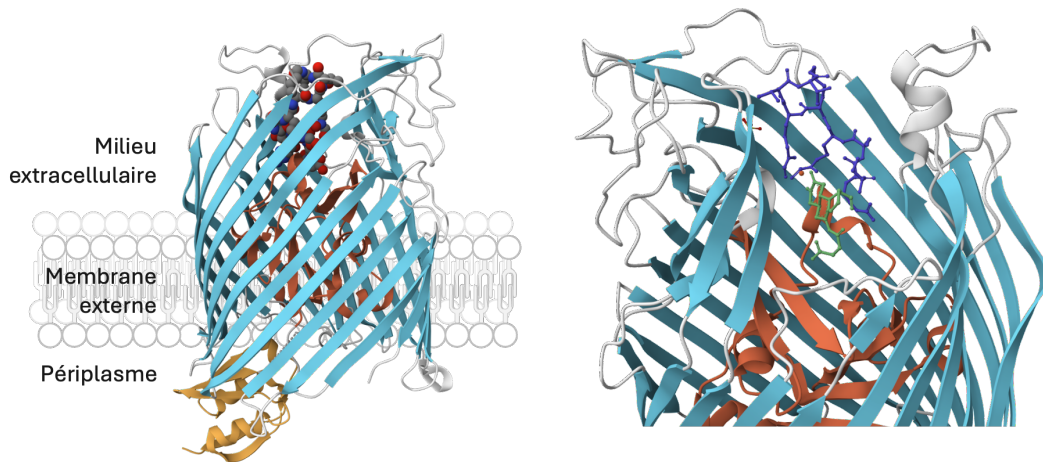
20A). La biosynthèse des acides aminés atypiques est réalisée par trois enzymes : PvdH qui permet la synthèse de la 2,4-diaminobutarate, et PvdA et PvdF qui permettent la synthèse de la formylhydroxyornithine (McMorran *et al.*, 2001). Enfin, PvdD finalise la biosynthèse du précurseur en incorporant deux résidus L-Thr, avant de libérer le précurseur du NRPS par l'intermédiaire de son domaine TE (Figure 20A).

Le précurseur cytoplasmique de la PVD est ensuite transloqué vers le périplasma par PvdE qui est un transporteur ABC permettant l'export du peptide (Yeterian *et al.*, 2010). Une fois dans le périplasma, la chaîne grasse est retirée du précurseur par l'acylase PvdQ pour former le précurseur de la PVD appelé ferribactine (Hannauer *et al.*, 2012). L'intermédiaire est ensuite transféré à la tyrosinase PvdP par l'intermédiaire de PvdM, une protéine ancrée dans la membrane interne du côté périplasmique (Mf *et al.*, 2022). PvdP assure ensuite la cascade de cyclisation oxydative permettant la cyclisation du chromophore à partir des résidus L-Dab et D-Tyr. L'oxydation finale du dihydroxyoverdine en PVD est réalisée par PvdO (Schalk *et al.*, 2020). Enfin, PvdN permet le remaniement de la chaîne latérale variable (Figure 20B) (Ringel and Brüser, 2018). PVD est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire par le système d'efflux ATP-dépendant PvdRT-OpmQ. Ce système se compose d'une protéine de membrane interne, PvdT, d'une protéine adaptatrice périplasmique, PvdR et d'un tonneau  $\beta$  inséré dans la membrane externe avec de larges extensions périplasmiques, OpmQ. Au moins une autre pompe à efflux serait également impliquée dans l'export de la PVD, mais celle-ci n'a pas encore été identifiée (Hannauer *et al.*, 2012).

#### 2.1.1.2 Import du fer par la PVD

Les pyoverdines sont des sidérophores hexadentés présentant une très forte affinité pour le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ( $p\text{Fe} = 27$  pour la PVD). Cette affinité résulte de la présence d'un groupement catéchol et deux groupements hydroxamate, qui forment un complexe octaédrique permettant la chélation d'un ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Le complexe ferri-PVD formé dans le milieu extracellulaire bactérien sera reconnu et transporté à travers la membrane externe par un TBDT spécifique, FpvA (Figure 3) (Poole *et al.*, 1991), et par un TBDT de plus large spécificité, FpvB (Ghysels *et al.*, 2004). La PVD doit obligatoirement être complexée au fer pour être reconnue et transportée par ces TBDTs (Greenwald *et al.*, 2008). Dans le cas de FpvA, cette reconnaissance implique une interaction de la chaîne peptidique avec le tonneau  $\beta$  et le chromophore avec le bouchon (Figure 21). FpvA est également

capable de reconnaître et de transporter quelques pyoverdines produites par d'autres espèces de *Pseudomonas* (Greenwald et al., 2008).



**Figure 21 :** Structure cristallographique de FpvA-ferri-PVD (PDB 2IAH) (Wirth *et al.*, 2007). En bleu est représenté le tonneau  $\beta$ , en rouge le bouchon, en jaune, le domaine de signalisation (SD) et en gris-rouge-bleu, la ferri-PVD. À droite, zoom sur la structure de la ferri-PVD dans son site de liaison dans FpvA avec en vert, le chromophore, en bleu, la chaîne peptidique et en orange, le fer.

Après le passage à travers la membrane externe *via* FpvA ou FpvB, des expériences de spectrométrie de masse en condition native ont montré que le complexe ferri-PVD se lie au complexe FpvC-FpvF dans le périplasma (Brillet *et al.*, 2012). De plus, des expériences de double hybride et de pull-down ont permis de montrer une interaction entre ces protéines et les 3 protéines de membrane interne FpvG, FpvH et FpvJ (Figure 22) (Bonneau *et al.*, 2020). Ces protéines forment un complexe membranaire et c'est au sein de ce complexe que se réalise la dissociation du fer de la PVD. Cette dissociation implique une réduction du fer et aucune modification de la PVD (Bonneau *et al.*, 2020).

Le fer, toujours en complexe avec la PVD, est alors réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par la réductase de membrane interne FpvG. L'activité de FpvG nécessite, pour être optimale, la présence de deux protéines de la membrane interne, FpvH et FpvK, et de la protéine périplasmique FpvJ (Figure 22) (Brillet *et al.*, 2012; Ganne *et al.*, 2017). Toutefois, leur rôle dans ce processus de réduction n'a pas encore été élucidé. FpvG appartient à une nouvelle famille de réductases localisées dans la membrane interne. Elle est homologue à FoxB, une réductase impliquée dans la réduction du fer en complexe avec les desferrioxamines. La résolution récente de la structure aux rayons X de FoxB a montré qu'il s'agit de réductases composées d'un dimère alpha ancré dans la membrane interne et implique deux molécules d'hèmes qui participent probablement à la réduction du fer *via* un

processus de transports d'électrons et à sa dissociation du sidérophore (Josts *et al.*, 2021). Cette famille de réductases semble exercer des fonctions redondantes dans la réduction du fer au niveau périplasmique chez *P. aeruginosa* : lorsque *fvpG* est délété, la dissociation du fer de la PVD se produit encore, mais de manière moins efficace, suggérant qu'une réductase issue d'une autre voie pourrait compenser cette fonction (Josts *et al.*, 2021).

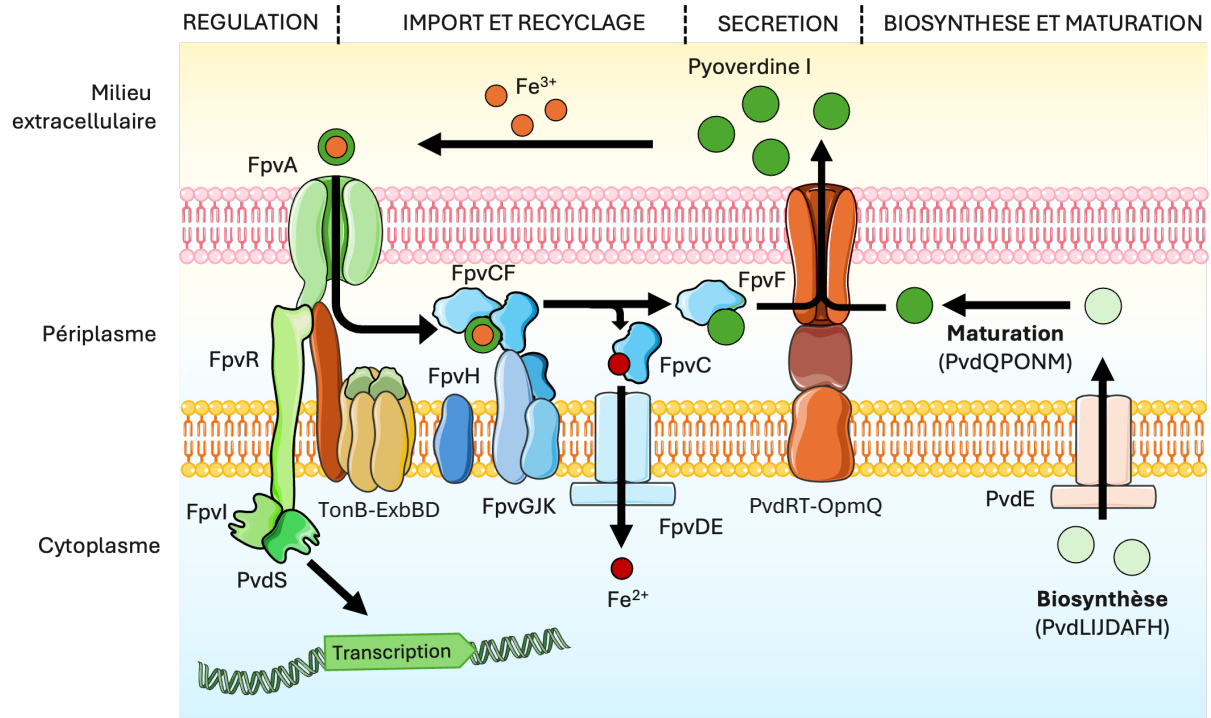


Figure 22 : Représentation schématique de la voie de la PVD chez *P. aeruginosa* PAO1. Pour plus de détails, voir le texte.

La réduction du fer va faciliter sa dissociation de la PVD et sa chélation par la protéine périplasmique FpVc. La structure aux rayons X du complexe FpVc- $Fe^{2+}$  montre une chélation du fer par un site d'hexahistidine de géométrie octaédrique permettant la stabilisation de l'ion  $Fe^{2+}$  formé (Vigouroux *et al.*, 2020). FpVc amène ensuite l'ion  $Fe^{2+}$  au transporteur ABC FpVDE, permettant le passage des ions  $Fe^{2+}$  à travers la membrane interne (Brillet *et al.*, 2012). Après la réduction du fer en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ), l'apo-PVD, qui n'a subi aucune modification chimique, et qui est lié à FpVF, est amené à la pompe à efflux PvdRT-OpmQ pour être recyclé dans le milieu extracellulaire (Figure 22) (Schalk *et al.*, 2002; Imperi *et al.*, 2009; Yeterian *et al.*, 2010).

### 2.1.1.3 Régulation de l'expression de la voie PVD

L'expression de la voie PVD est régulée par Fur. Lorsque la concentration intracellulaire en fer diminue, Fur se dissocie de la Fur box, située en amont des gènes impliqués dans l'acquisition du fer, levant ainsi sa répression transcriptionnelle et permettant la transcription de ces gènes en réponse à la carence en fer. La régulation de l'expression de la voie fait également intervenir trois autres acteurs : un facteur anti-sigma, FpvR, associé à deux facteurs sigma, FpvI et PvdS (Figure 4, partie de gauche). Ce système est atypique, car il active deux ECF sigma au lieu d'un seul, contrairement aux régulations classiques *via* ce type de système (Lamont *et al.*, 2002). De plus, FpvI et PvdS ne sont pas codés au sein d'un même opéron, à la différence des autres systèmes sigma/anti-sigma (Stover *et al.*, 2000). La liaison du complexe ferri-PVD au site de liaison de FpvA va conduire à une transduction du signal à travers le transporteur, rendant accessible le domaine de signalisation (SD), qui était jusqu'alors lié à la TonB box. Le SD pourra alors interagir avec la région périplasmique de FpvR et conduire à la libération des deux facteurs sigma FpvI et PvdS (Brillet *et al.*, 2007). FpvI va alors activer la transcription de *fpvA* et PvdS, la transcription des gènes codant pour les protéines impliquées dans la biosynthèse, la sécrétion et l'utilisation de la PVD par la bactérie. Ces régulations impliquent la liaison de FpvI et PvdS à la région promotrice des gènes dépendant de leur régulation.

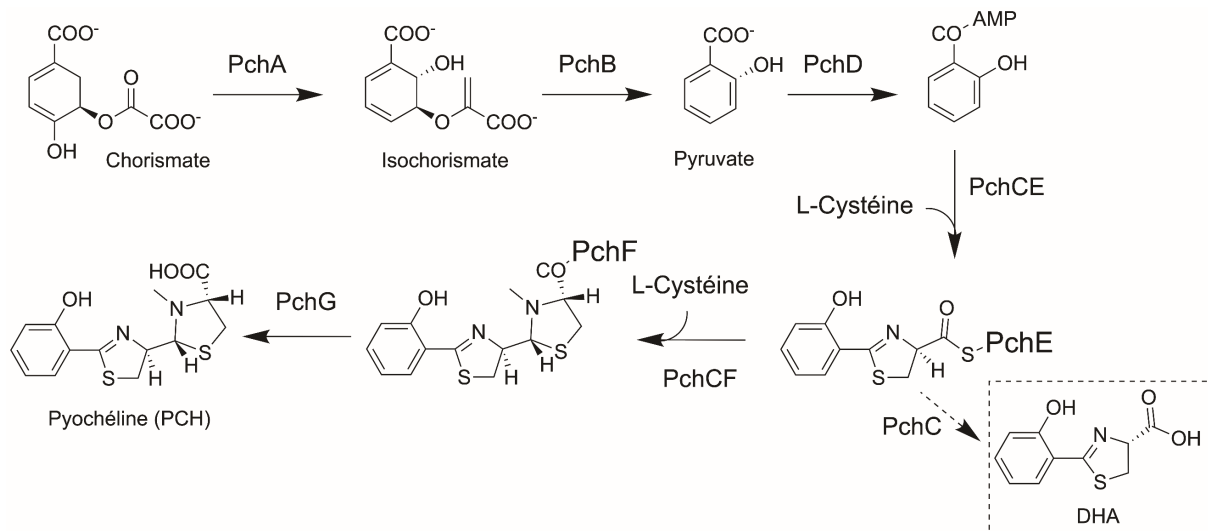
En plus de son rôle dans l'acquisition du fer, la voie PVD joue un rôle majeur dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques par l'activité pléiotrope de PvdS qui est impliqué dans la régulation d'au moins 26 gènes. En plus des voies d'acquisition du fer, PvdS régule l'expression de protéines impliquées dans la virulence (exotoxine A, ToxA), le QS (PqsR) ou encore les systèmes de sécrétion (ExsA, contrôlant le système de sécrétion de type III), témoignant du rôle majeur des voies d'import du fer et de la voie PVD dans le fitness de la bactérie et de sa rapide capacité d'adaptation (Lamont *et al.*, 2002).

### 2.1.2 La voie d'import du fer par la pyochéline (PCH)

#### 2.1.2.1 Biosynthèse et sécrétion de la PCH

La pyochéline (PCH), second sidérophore produit par *P. aeruginosa*, a été décrite pour la première fois en 1981 par Cox et Graham comme une molécule chélatrice de fer stimulant la croissance bactérienne (Cox *et al.*, 1981). Il s'agit d'un sidérophore de faible poids moléculaire, et hydrophobe

qui se compose de deux hétérocycles thiazoline et thiazolidine, se liant au fer avec une stoechiométrie 2 : 1 (PCH : Fe) (Tseng *et al.*, 2006). La PCH est considérée comme le sidérophore de faible affinité pour le fer de *P. aeruginosa* ( $pFe = 16$ ) (Brandel *et al.*, 2012). Elle est également produite par d'autres espèces du genre *Burkholderia* avec lesquelles *P. aeruginosa* est retrouvée en co-infection (Farmer and Thomas, 2004).



**Figure 23 :** Voie de biosynthèse de la pyochéline (PCH) chez *P. aeruginosa* et en pointillés, la potentielle accumulation du dérivé acide dihydroaéroginoïque (DHA).

La PCH est le produit de la condensation d'un salicylate et de deux résidus cystéines, impliquant sept enzymes cytoplasmiques et deux NRPS organisées en deux opérons, *pchDCBA* et *pchEFGHI* (Figure 23) (Serino *et al.*, 1997; Reimann *et al.*, 1998). Le salicylate est d'abord synthétisé à partir du chorismate par l'isochorismate synthase, PchA, et l'isochorismate-pyruvate synthase, PchB. Il est ensuite activé par adénylation *via* PchD, et transféré au NRPS PchE qui catalyse l'épimérisation d'une L-cystéine en D-cystéine et sa cyclisation en un motif thiazoline, formant l'acide dihydroaéroginoïque (DHA) (Serino *et al.*, 1997; Reimann *et al.*, 1998; Gaille *et al.*, 2003; Meneely *et al.*, 2014). Le second NRPS, PchF, intègre une deuxième cystéine et catalyse sa cyclisation en un second cycle thiazoline. L'activité de PchE et PchF est sous le contrôle d'une thioestérase PchC, qui optimise la biosynthèse de la PCH en libérant les sites de liaison peptidique des NRPS (Reimann *et al.*, 2004). PchG va ensuite réduire une thiazoline en thiazolidine, qui est méthylée par PchF. La PCH mature est finalement libérée du NRPS par l'action de la réductase PchG (Figure 23). La biosynthèse de la PCH peut également conduire à l'accumulation d'un dérivé, l'acide

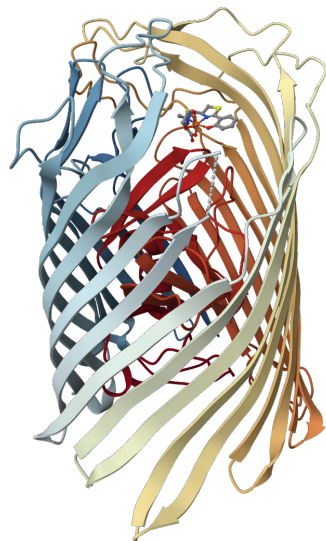
dihydroaéruinoïque (DHA), par clivage du salicylate lié à PchE par la thioestérase PchC (Figure 23) (Reimmann *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 2014; Mevers *et al.*, 2019; Cornelis, 2020).

Actuellement, aucun mécanisme d'export de la PCH n'a été élucidé, bien que certaines pistes soient envisagées. Une hypothèse récente, a montré l'implication potentielle du système d'efflux MacAB-TolC (PA4063-PA4066) dans une partie de la sécrétion de la PCH chez *P. aeruginosa* (Secli *et al.*, 2024). Ces données restent toutefois à confirmer.

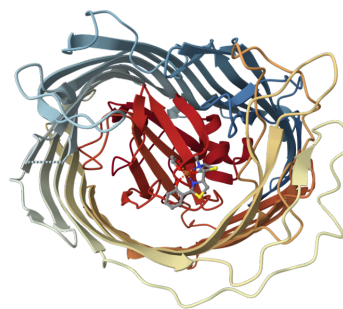
#### 2.1.2.2 Import du fer et régulation de l'expression de la voie PCH

Le complexe ferri-PCH formé dans l'environnement bactérien est pris en charge au niveau de la membrane externe par le transporteur FptA, qui présente les caractéristiques typiques du TBDT avec un tonneau  $\beta$  formant un pore et obstrué en N-terminal par un bouchon contenant la TonB box (Ankenbauer and Quan, 1994; Cobessi *et al.*, 2005). Bien que la liaison de l'ion ferrique implique la chélation par deux molécules de PCH, la résolution de la structure de FptA montre qu'une seule molécule de PCH est nécessaire pour la reconnaissance du complexe ferri-PCH par FptA. La coordination bidentate restante peut en effet être assurée par une autre molécule que la PCH (Figure 24) (Cobessi *et al.*, 2005).

**Vue parallèle à la membrane**



**Vue du côté extracellulaire**



**Figure 24** : Structure cristallographique de FptA lié au complexe ferri-PCH (stœchiométrie 1 : 1) (PDB 1XKW) (Cobessi *et al.*, 2005).

Une fois dans le périplasma, une première partie des complexes ferri-PCH est directement transportée vers le cytoplasme par la perméase FptX dont l'action est dépendante de la PMF. La



seconde partie des complexes ferri-PCH est dissociée en PCH et en fer libre ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par un mécanisme inconnu et les ions  $\text{Fe}^{2+}$  seront transloqués dans le cytoplasme par un transporteur ABC hétérodimérique PchHI (Figure 25). Des expériences de double hybride chez *Escherichia coli* ont permis de montrer que PchHI interagit également avec FptX pour former un complexe multiprotéique (Roche *et al.*, 2021).

Les complexes ferri-PCH présents au niveau cytoplasmique serviront alors de ligand à PchR (Figure 25). Le complexe PchR-ferri-PCH formé permettra en effet à PchR d'interagir avec les régions promotrices des gènes de la voie PCH, conduisant à l'activation de leur transcription, tout en réprimant sa propre expression (Michel *et al.*, 2005, 2007). En cas de forte carence en fer, PchR est capable d'interagir seul avec sa région promotrice et d'induire l'activation de la transcription des gènes de la voie PCH (Cunrath *et al.*, 2020). L'expression de ce système est également régulée par le fer *via* Fur.

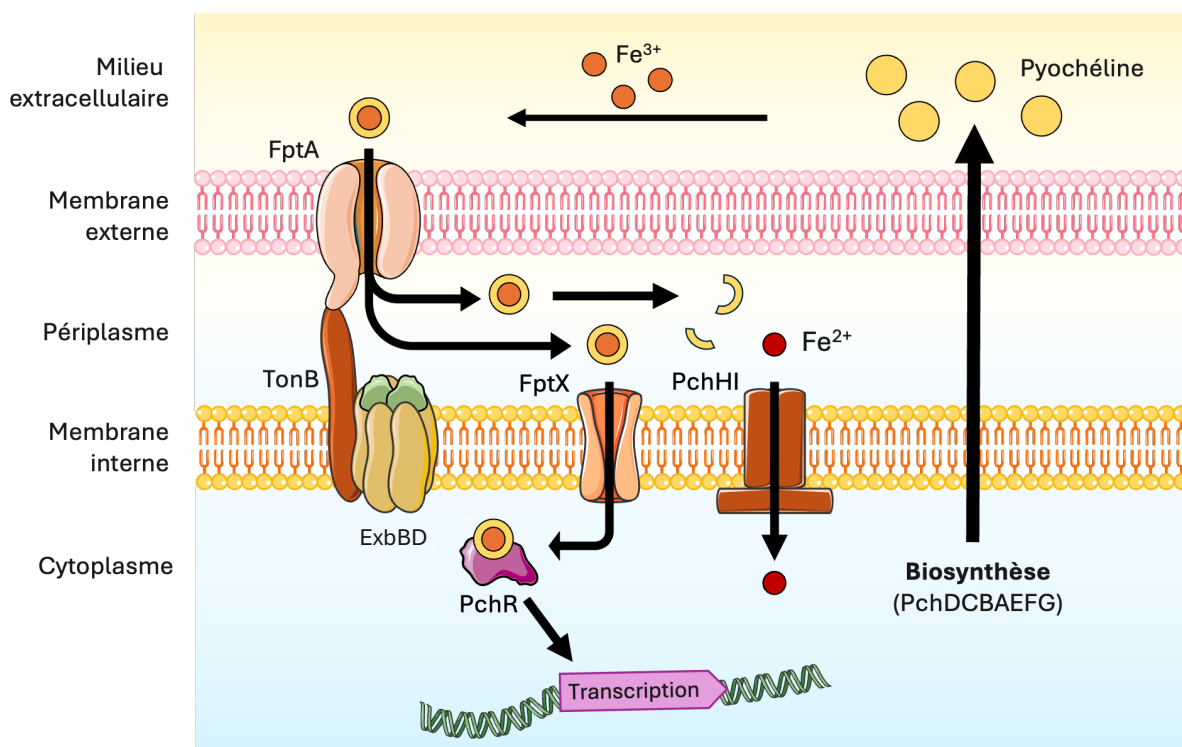


Figure 25 : Représentation schématique de la voie de la PCH chez *P. aeruginosa* PAO1. Pour plus de détails, voir le texte.

La capacité de *P. aeruginosa* à synthétiser et sécréter deux sidérophores permet à la bactérie de répondre au mieux aux changements environnementaux. En effet, en début d'infection et en condition de faible carence en fer, la bactérie va privilégier la production de PCH. Bien qu'étant un



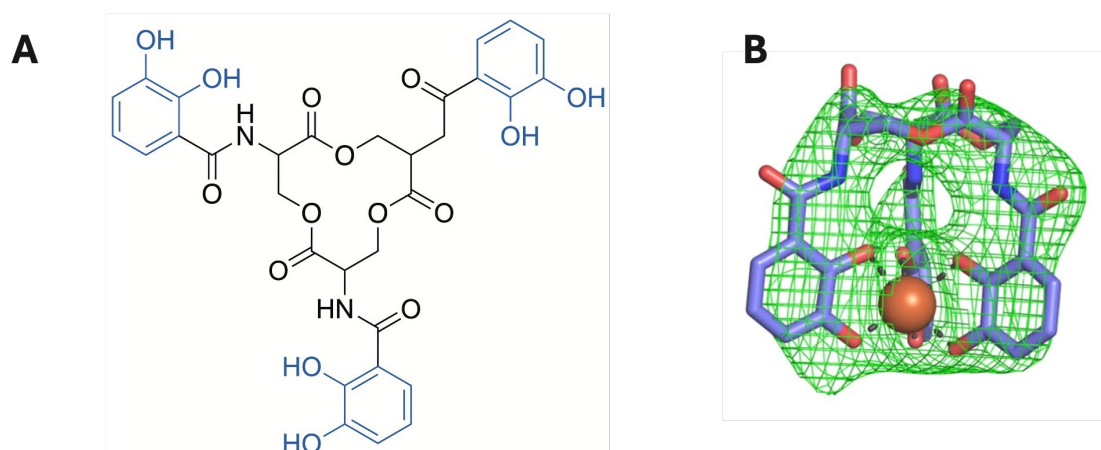
plus faible chélateur de fer, sa synthèse est moins coûteuse pour la bactérie d'un point de vue énergétique et sa production suffit à répondre aux besoins en fer de la bactérie. Lorsque la carence en fer s'accroît, la bactérie va privilégier la production de PVD, qui a une meilleure affinité pour le fer. Ainsi, ces deux voies permettent de manière complémentaire de répondre au mieux aux concentrations fluctuantes en fer dans l'environnement bactérien (Dumas *et al.*, 2013; Cunrath *et al.*, 2015).

## 2.2 Voies d'import du fer par les xénosidérophores

### 2.2.1 Import du fer par les sidérophores de type catéchol

#### 2.2.1.1 Les sidérophores bi- et tricatécholés

L'entérobactine (ENT) est un sidérophore tricatécholé de structure cyclique formée par un cycle lactone, intégrant trois unités de L-serine estérifiées et liées à un groupement catéchol (Figure 26A). Il constitue l'archétype des sidérophores tricatécholés. Ses trois groupements catéchols assurent une liaison hexadentate particulièrement stable avec l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  (Figure 26B). À ce jour, l'ENT est le sidérophore présentant la meilleure affinité pour le fer ferrique connue ( $K_a = 10^{49} \text{ M}^{-1}$ ) avec une stœchiométrie pour la chélation du fer de 1 : 1 (Loomis and Raymond, 1991). Toutefois, sous sa forme non liée au fer, il est rapidement oxydé en quinones (Neilands, 1973). L'ENT est produit par des bactéries appartenant aux Enterobacteriaceae comme *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei* ou encore *Salmonella typhimurium*, ainsi que certaines espèces de *Streptomyces* (O'Brien and Gibson, 1970; Pollack and Neilands, 1970; Perry and San Clemente, 1979; Fiedler *et al.*, 2001).



**Figure 26 :** Structure chimique de l'entérobactine (ENT). **A.** Les groupements chélateurs de type catéchol sont représentés en bleu. **B.** Densité d'électrons  $F_0$  et  $F_c$  autour du complexe ferri-ENT où les atomes de carbone sont représentés en bleu, les atomes d'azote en bleu foncé et les atomes d'oxygène en rouge. L'ion  $\text{Fe}^{3+}$  est représenté par la sphère orange. Figure adaptée de Moynié *et al.*, 2019.

Chez *E. coli*, l'import du complexe ferri-ENT à travers la membrane externe est spécifiquement assuré par le TBDT FepA. On retrouve chez *P. aeruginosa*, un analogue de FepA, appelé PfeA ayant une forte affinité pour l'ENT ferrique, bien que la bactérie ne produise pas d'ENT (Dean and Poole, 1993). La structure aux rayons X de PfeA a été résolue et montre deux sites de liaison pour le complexe ferri-ENT : le complexe est d'abord reconnu par un premier site de liaison localisé au niveau des boucles extracellulaires du tonneau. Cette liaison induit alors un changement conformationnel facilitant sa migration vers le second site de liaison, caractéristique de tous les TBDTs (Figure 27). Cette liaison permet ainsi le passage de ferri-ENT à travers la membrane externe (Moynié *et al.*, 2019).

Dans le périplasma, le cycle lactone sous sa forme de complexe ferri-ENT est hydrolysé par l'estérase PfeE en trois molécules cycliques de N-(2,3 dihydroxybenzoyl) sérine (DHBS), liant toujours le fer. La libération de l'ion ferrique implique une réductase périplasmique ou cytoplasmique non identifiée à ce jour (Figure 28) (Perraud *et al.*, 2018; Gasser *et al.*, 2021). La transcription et, par conséquent, l'expression de *pfeA* et *pfeE* est induite par la présence d'ENT *via* le système à deux composants PfeS/PfeR, composé d'un senseur, PfeS, et d'un régulateur transcriptionnel, PfeR. PfeS détecte la présence de ferri-ENT dans le périplasma, qui libère PfeR qui va alors pouvoir induire la transcription de *pfeA* et *pfeE*, en réponse à la présence d'ENT-Fe dans le périplasma. L'expression de ce système est également régulée par le fer *via* Fur (Figure 28) (Dean *et al.*, 1996; Gasser *et al.*, 2021).

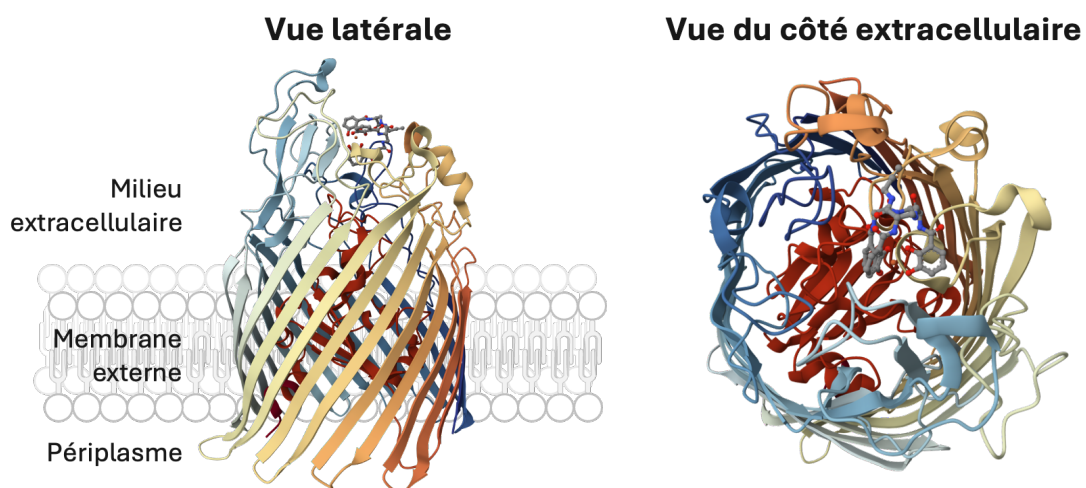


Figure 27 : Structure aux rayons X de PfeA liant le complexe ferri-ENT au niveau du premier site de liaison situé au niveau des larges boucles extracellulaires du tonneau  $\beta$  (PDB 6Q5E) (Moynié *et al.*, 2019).

Un second TBDT, PirA, est également impliqué dans l'import de la ferri-ENT chez *P. aeruginosa* et jouerait un rôle dans l'induction de l'expression initiale de *pfeA* en réponse à la présence d'ENT-Fe (Dean *et al.*, 1996; Ghysels *et al.*, 2005). La transcription de *pirA* est sous la régulation d'un système à deux composants PirS/PirR, situé en amont de *pirA* et dont le fonctionnement est similaire à PfeS/PfeR (Figure 28). Toutefois, bien que la ferri-ENT soit transportée par PirA, sa présence dans le périplasma n'induit pas l'expression de *pirA* via le système PirS/PirR (Gasser *et al.*, 2021). Que les complexes ENT-Fe soient importés dans le périplasma via PfeA ou PirA, l'hydrolyse du sidérophore est assurée dans tous les cas par PfeE, permettant la libération du fer.

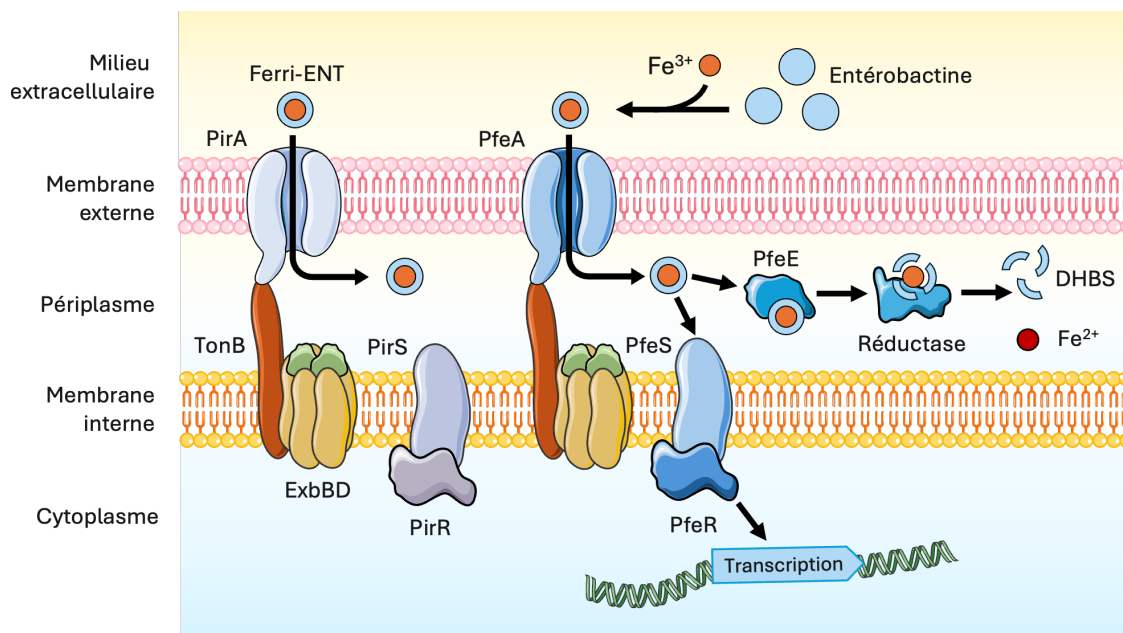


Figure 28 : Voie d'acquisition du fer par l'ENT chez *P. aeruginosa*.

En plus de l'induction de la transcription de *pfeA* et *pfeE* chez *P. aeruginosa*, la présence des complexes ferri-ENT va également conduire à la répression des gènes impliqués dans la biosynthèse et l'import du fer par la PCH, indiquant que la bactérie privilégie la voie de l'ENT pour accéder au fer de l'environnement lorsque ce xénosidérophore est présent (Gasser *et al.*, 2016, 2021). Ceci peut s'expliquer par la plus faible affinité de la PCH pour le fer ( $10^{18} \text{ M}^{-2}$ ) par rapport à l'ENT ( $10^{49} \text{ M}^{-1}$ ) (Brandel *et al.*, 2012). La présence d'ENT ferrique n'impacte toutefois pas la transcription des gènes codant pour les protéines de la voie PVD, probablement du fait de sa meilleure affinité pour le fer ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$ ) ou des mécanismes de régulation différents (Albrecht-Gary *et al.*, 1994; Gasser *et al.*, 2016, 2021).

L'azotochéline et la protochéline, sont respectivement des bi- et tri-catéchols produits par *Azotobacter vinelandii*. Ils peuvent également être utilisés par *P. aeruginosa* pour accéder au fer *via* le transporteur PfeA (Gasser *et al.*, 2016; Moynié *et al.*, 2019). Malgré leur structure chimique différente (Figure 29), les complexes ferri-azotochéline et ferri-protochéline peuvent également se lier aux sites de liaison de PfeA. Dans le cas de l'azotochéline, qui est tétradentée, la sphère de coordination avec l'ion  $Fe^{3+}$  est complétée par une seconde molécule qui peut être un monocatéchol, un citrate ou la cépabactine (Moynié *et al.*, 2019). La présence des complexes ferriques de l'azotochéline et la protochéline induit également la transcription de *pfeA* et *pfeE* *via* le système à deux composants PfeS/PfeR, ainsi que la répression de la transcription des gènes de la voie PCH, indiquant un fonctionnement similaire à l'ENT (Gasser *et al.*, 2016). Enfin, les Enterobacteriaceae comme *E. coli*, des souches de *Klebsiella* ou encore de *Salmonella* produisent également une entérobactine C-glucosylée, appelée salmochéline, en réponse à l'immunité nutritionnelle (Figure 29) (Müller *et al.*, 2009). Des données préliminaires réalisées au laboratoire ont permis de montrer que *P. aeruginosa* l'utilise pour accéder au fer *via* un TBDT non identifié.

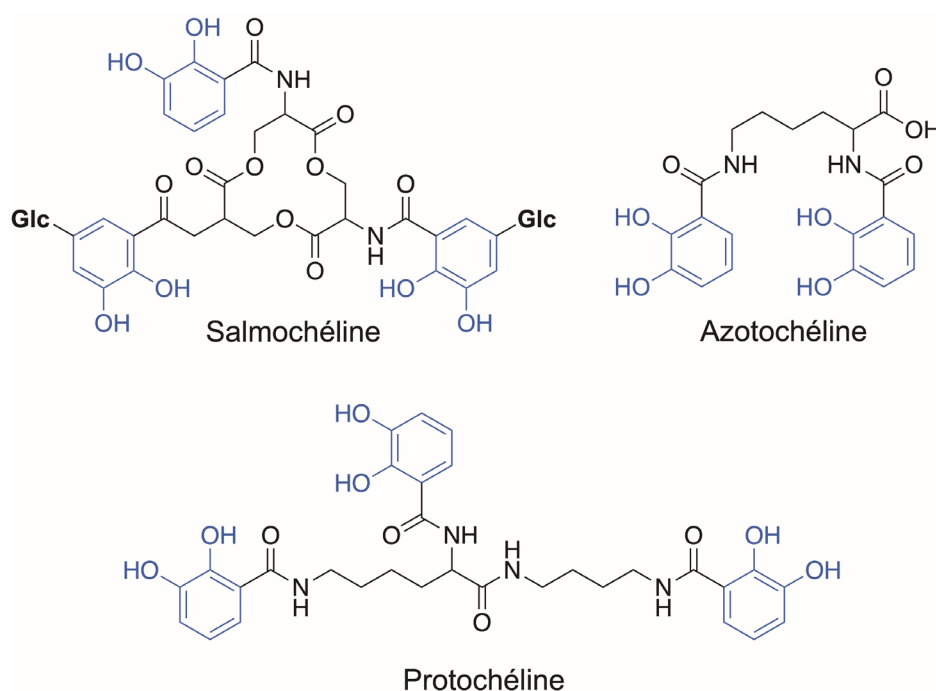


Figure 29 : Structure chimique des tricatéchols salmochéline, protochéline et du biscatéchol azotochéline. La fonction catéchol est représentée en bleu.

### 2.2.1.2 Les monocatéchols

Chez les vertébrés, les neurotransmetteurs de type catécholamine participent à la signalisation neuronale et se retrouvent dans les systèmes nerveux, digestif et circulatoire. Lors d'infections, ils favorisent la croissance et la virulence bactérienne (Verbrugghe *et al.*, 2012), suggérant leur utilisation par les bactéries comme sidérophores lors d'infections chroniques. *P. aeruginosa* exploite en effet les catécholamines (dopamine, L-DOPA, épinéphrine, norépinéphrine) pour capter le fer sous forme de complexes ferriques de stœchiométrie 3 : 1, ou probablement en complexe avec d'autres chélateurs permettant d'assurer la coordination hexadentate de l'ion ferrique (Perraud, Kuhn, *et al.*, 2020). *P. aeruginosa* peut également utiliser des polyphénols végétaux à groupement catéchol comme l'acide chlorogénique, l'acide caféique, la quercétine et la lutéoline, pour capter le fer (Figure 30) (Luscher *et al.*, 2022).

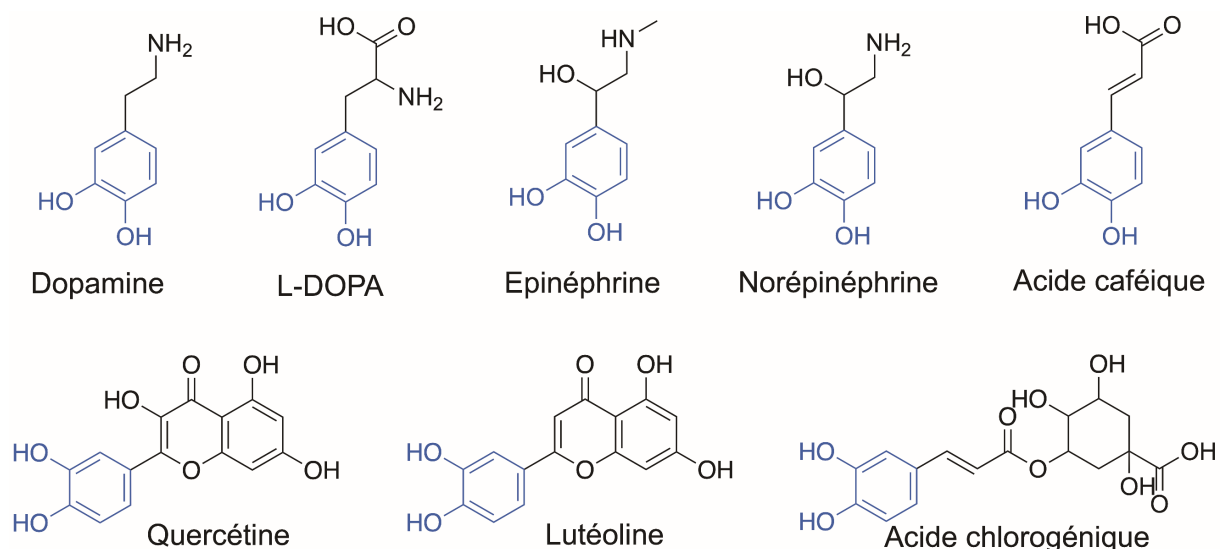


Figure 30 : Structure des monocatéchols utilisés comme xénosidérophores par *P. aeruginosa* pour capter le fer. Les fonctions catéchols sont représentées en bleu.

Le transport de ces molécules à travers la membrane externe est assuré par les TBDTs PirA et PiuA. Toutefois une diffusion par des porines serait également possible, notamment pour la dopamine (Perraud, Kuhn, *et al.*, 2020). Le fer en complexe avec les monocatéchols serait ensuite réduit en fer ferreux par l'oxydoréductase PiuB, permettant sa libération dans le périplasme (Figure 31). En effet *piuB*, situé en amont de *piuA*, code pour une réductase de la même famille que FpvG et FoxB, décrites précédemment et dont la fonction est probablement redondante (Josts *et al.*, 2021). Le devenir des ions  $\text{Fe}^{2+}$  après leur dissociation du sidérophore reste encore à déterminer et fait probablement

intervenir la protéine cytoplasmique PiuC, dont le gène est situé en aval de *piuA*. La présence périplasmique des monocatéchols induit l'expression de *pirA* via le système à deux composants PirS/PirS, où ils lient PirS, permettant à PirR de jouer son rôle de régulateur transcriptionnel (Figure 31) (Perraud, Kuhn, *et al.*, 2020; Luscher *et al.*, 2022). L'expression de ces voies est également dépendante de la concentration intracellulaire en fer via Fur.

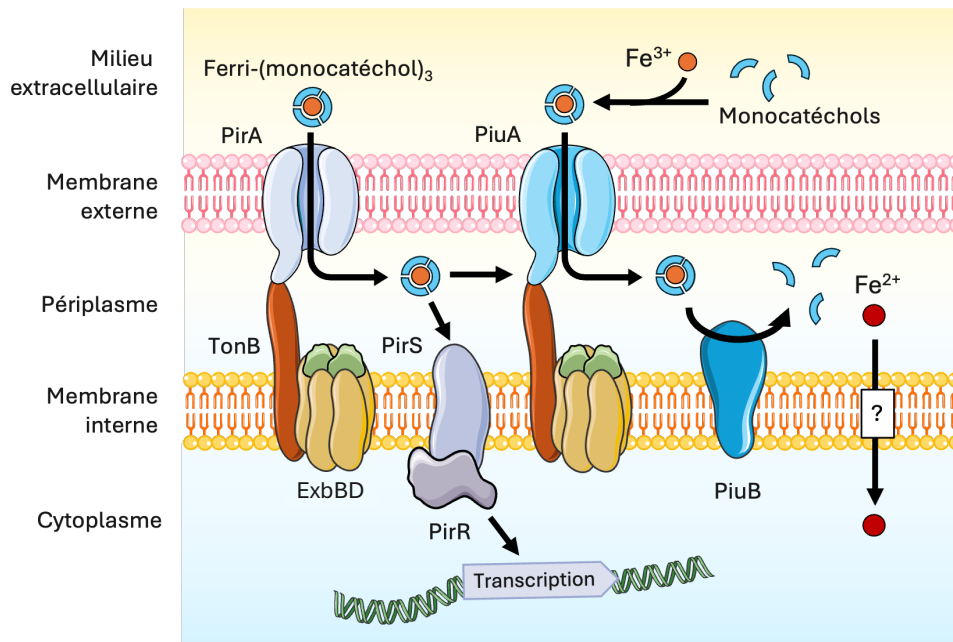
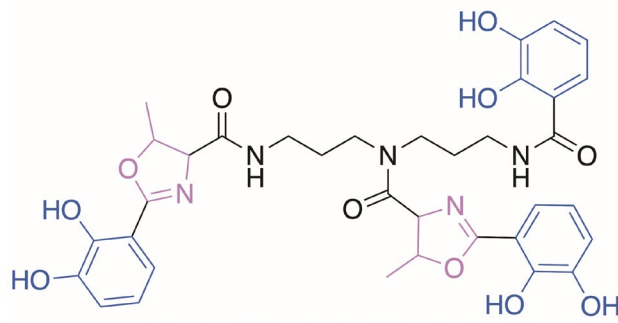


Figure 31 : Voie d'acquisition du fer par les monocatéchols chez *P. aeruginosa*. Trois monocatéchols sont nécessaires pour lier un ion  $Fe^{3+}$ . Les protéines jouant un rôle hypothétique dans la voie sont encadrées en blanc.

### 2.2.1.3 La vibriobactine

La vibriobactine (VIB) est un sidérophore de type catéchol mixte, synthétisé par *Vibrio cholerae*. Sa structure repose sur trois groupements catéchols (en bleu), dont deux sont reliés à un noyau oxazoline (en rose) (Figure 32). Ces groupements confèrent à la VIB une coordination particulière avec le fer, distincte des autres catéchols où les trois groupements catéchols participent uniquement aux cinq liaisons avec l'ion ferrique, la sixième liaison étant assurée par l'atome d'azote présent sur le groupement oxazoline (Figure 32). Comme trois fonctions catéchols et deux oxazolines sont présentes dans la structure de la VIB, divers complexes VIB-Fe peuvent se former avec des coordinations différentes (Li *et al.*, 2012).



**Figure 32 :** Structure chimique de la vibriobactine produite par *Vibrio cholerae*. Les groupements impliqués dans la coordination avec le fer sont représentés en couleur : en bleu, les groupements catéchols et en rose, les noyaux oxazolines.

*P. aeruginosa* possède un TBDT, FvbA, associé au transport de la ferri-VIB à travers la membrane externe (Figure 33). FvbA possède une forte homologie avec le TBDT ViuA, impliqué dans le transport de la VIB chez *V. cholerae* (Elias *et al.*, 2011). Les complexes ferri-VIB seraient vraisemblablement transportés à travers la membrane interne par le transporteur ABC FepBDG. En effet, le gène *fvbA* est situé en amont de l'opéron *fep* (*fepC*, *fepB*, *fepD* et *fepG*), qui code pour le transporteur FepBDG ainsi qu'une protéine de liaison périplasmique, FepC. Ce système a été nommé par analogie au système *fep* retrouvé chez *E. coli*, impliqué dans l'import de la ferri-ENT. Toutefois, malgré cette localisation proche de *fvbA*, la délétion des gènes codant ce transporteur n'affecte pas l'import de la ferri-VIB chez *P. aeruginosa*, soit parce qu'il n'est pas impliqué dans l'import de la ferri-VIB, soit parce que ces systèmes d'import sont redondants (Elias *et al.*, 2011). Une fois dans le cytoplasme, le fer en complexe avec la VIB pourrait être réduit en fer ferreux par l'oxydoréductase PA4155, codé par un gène situé directement en amont de *fvbA*, son implication restant cependant à confirmer (Figure 33).

L'expression de FvbA est régulée par la carence en fer *via* Fur mais également par un régulateur de type IclR, FvbR (PA4157), dont le gène est situé en aval de *fvbA*. FvbR est un régulateur négatif impliqué dans la régulation de *fvbA*. La présence cytoplasmique de la VIB neutralise alors l'activité répressive de FvbR, conduisant à l'activation de la transcription de *fvbA* (Figure 33) (Elias *et al.*, 2011).



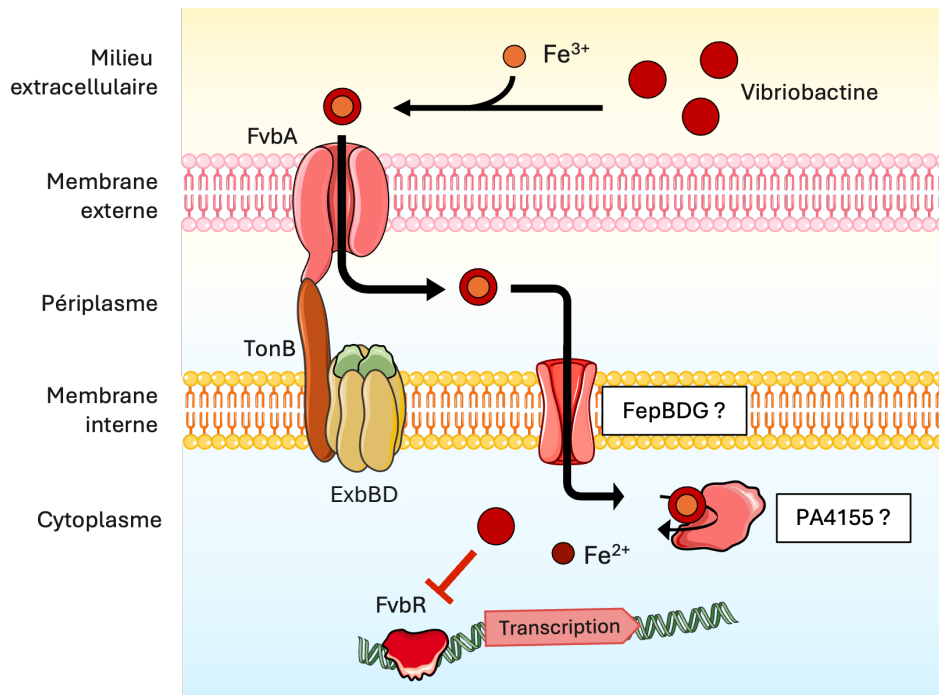


Figure 33 : Voie d'acquisition du fer de la vibriobactine (VIB) chez *P. aeruginosa*. Les protéines jouant un rôle hypothétique dans la voie sont encadrées en blanc.

### 2.2.2 Import du fer par les sidérophores de type hydroxamate

Contrairement aux catéchols, les sidérophores de type hydroxamate sont majoritairement produits par les mycètes et certaines bactéries, notamment les Actinomycètes. Ils se subdivisent en cinq sous-familles selon leur structure chimique : ferrioxamines, ferrichromes, fusarinines, coprogènes et acides rhodotoruliques. Lorsque j'ai entrepris ma thèse, seules les voies d'import du fer par les sidérophores ferrichrome, nocardamine, desferrioxamine B et bisucabérine étaient décrites chez *P. aeruginosa*.

#### 2.2.2.1 Desferrioxamines

La desferrioxamine B (DFOB) et la desferrioxamine E (DFOE), également connue sous le nom de nocardamine (NOCA), sont des sidérophores produits par des Actinomycètes, notamment par des espèces du genre *Streptomyces* mais également par *P. stutzeri* dans le cas de la NOCA (Essén *et al.*, 2007). La DFOB constitue la forme linéaire de la NOCA cyclique, et se compose de trois unités répétées de N-hydroxy-1,5-diaminopentane reliées par des liaisons amides et par un groupement acétamide en position terminale (Figure 34). La chélation du fer par ces sidérophores se fait avec une stœchiométrie de 1 : 1, et la DFOB présente une affinité pour le fer légèrement inférieure à celle de la NOCA, avec un  $K_a$  de  $10^{30} \text{ M}^{-1}$  pour la DFOB contre  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  pour la NOCA (Anderegg *et al.*, 1963b).



Cette différence s'explique par une conformation plus rigide de la NOCA cyclique, favorisant la coordination de l'ion  $Fe^{3+}$  (Figure 34).

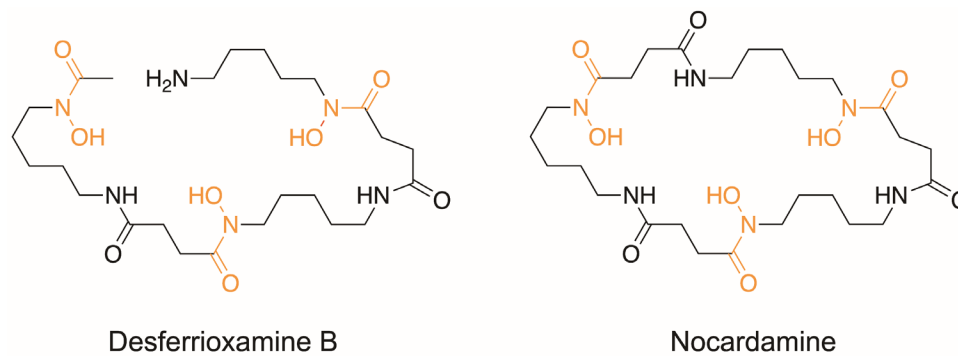
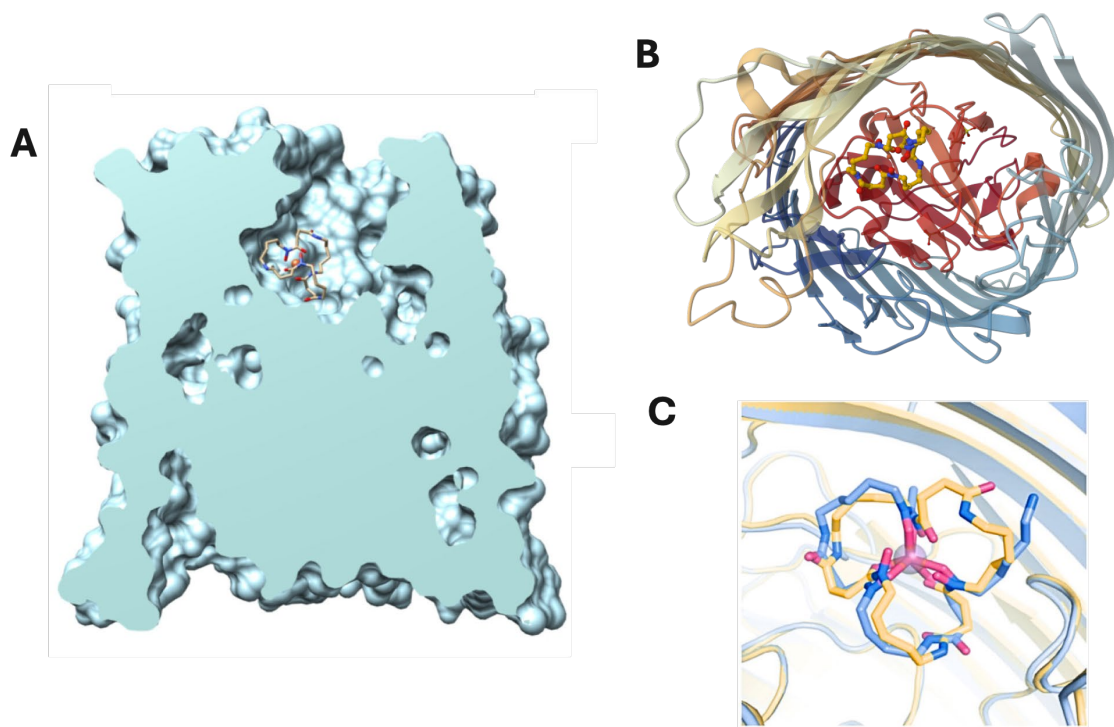


Figure 34 : Structure chimique de la desferrioxamine B et de la nocardamine (desferrioxamine E). Les groupements chélateurs de type hydroxamate sont représentés en orange.

Chez *P. aeruginosa*, l'import des complexes ferri-desferrioxamines à travers la membrane externe est assuré par FoxA (Figure 35) (Llamas *et al.*, 2006). Dans le cas de la DFOB, un second transporteur, FpvB, intervient également dans cet import (Figure 38) (Chan and Burrows, 2022). La résolution de la structure aux rayons X de FoxA a révélé un positionnement identique des deux complexes ferri-NOCA (forme cyclique) et ferri-DFOB (forme linéaire) dans le site de liaison du transporteur, avec une orientation vers l'espace extracellulaire (Figure 35C) (Normant *et al.*, 2020). Il a été démontré dans le cas de la NOCA que sa liaison avec FoxA est stabilisée par des liaisons hydrogènes avec les chaînes latérales des acides aminés bordant le site de liaison (Figure 35A-B). Toutefois, la ferri-NOCA présente une affinité plus élevée pour le site de liaison de FoxA que la ferri-DFOB (Josts *et al.*, 2019; Normant *et al.*, 2020). La boucle extracellulaire L8 de FoxA, dotée d'une certaine flexibilité, jouerait également un rôle clé dans le transport en modulant l'accès des molécules au canal du transporteur (Chan *et al.*, 2023).

Dans le périplasma, la réductase FoxB, homologue de FpvG – connue pour son rôle dans la dissociation du fer de la PVD – intervient dans la réduction du fer nécessaire à sa libération à partir des desferrioxamines (Cuív *et al.*, 2006; Josts *et al.*, 2021). FoxB exercerait une fonction redondante avec d'autres réductases périplasmiques de la même famille, car la délétion de *foxB* permet toujours à la bactérie d'acquérir le fer par la NOCA (Josts *et al.*, 2021). Le mécanisme d'import du fer ferreux à travers la membrane interne reste toutefois à élucider (Figure 38). Il a cependant été récemment proposé que l'opéron PA2912-2914, codant pour un transporteur ABC putatif présentant une

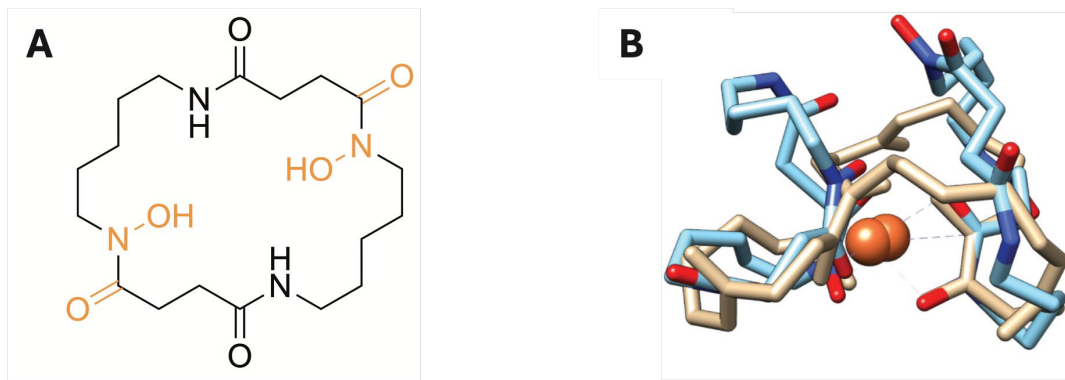
homologie au transporteur HmuUVT impliqué dans l'import des sidérophores de type hydroxamate chez *Sinorhizobium meliloti*, pourrait jouer un rôle dans ce processus (Josts *et al.*, 2021).



**Figure 35 :** Structure aux rayons X de FoxA lié au complexe ferri-NOCA. A. Vue en coupe et B. Vue du côté extracellulaire du complexe ferri-NOCA dans la poche de liaison de FoxA (PDB 6Z8A). C. Position du complexe ferri-NOCA (en orange) et ferri-DFOB (en bleu) dans le site de liaison de FoxA (Adapté de Normant *et al.*, 2020).

La transcription de *foxA* et *foxB* est régulée positivement par le système ECF sigma/anti-sigma FoxI/FoxR (Figure 38) (Llamas *et al.*, 2006; Normant *et al.*, 2020; Josts *et al.*, 2021). Tout comme FpvA, FoxA possède un domaine de signalisation N-terminal capable d'interagir avec le facteur anti-sigma FoxR. Lorsque le complexe ferri-NOCA se lie à FoxA, ce domaine est alors exposé dans le périplasma et interagit avec FoxR, entraînant la libération du facteur sigma FoxI, qui va initier la transcription des gènes de la voie *fox* (Cuív *et al.*, 2006; Josts *et al.*, 2019). De plus, en cas de carence en fer et en présence de DFOB, les niveaux d'expression de FoxA peuvent être 100 fois supérieurs à ceux de la protéine TonB, soulignant l'importance stratégique de ce système dans l'acquisition du fer (Josts *et al.*, 2019). Toutefois, contrairement à l'ENT, l'induction de la voie *fox* n'entraîne aucune modification de l'expression des voies endogènes de *P. aeruginosa* (Normant *et al.*, 2020). Enfin, l'expression de *foxA* et *foxI* est également régulée par la concentration intracellulaire en fer *via* le régulateur global Fur (Llamas *et al.*, 2006; Josts *et al.*, 2021).

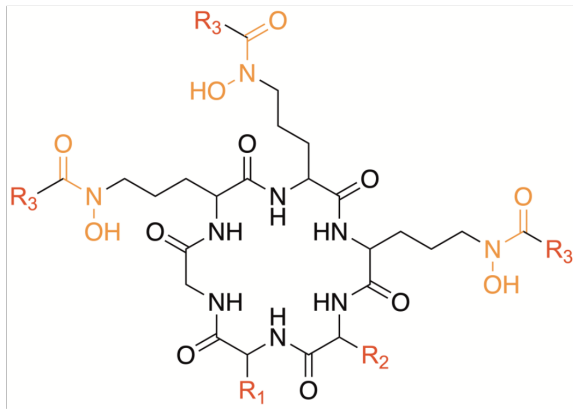
Récemment, la bisucabérine, un sidérophore cyclique analogue à la NOCA et produit par des espèces bactériennes marines (Figure 36A), a été décrit comme capable d'importer le fer chez *P. aeruginosa* via le transporteur FoxA (Figure 38). Contrairement à la DFOB et la NOCA, la bisucabérine chélate le fer avec une stoechiométrie de 3 : 2 (bisucabérine : Fe<sup>3+</sup>) (Figure 36B) (Chan *et al.*, 2023). La structure cristallographique du complexe ferri-bisucabérine avec FoxA révèle une conformation similaire à celle de la ferri-NOCA, mais avec des liaisons hydrogènes distinctes, traduisant d'une spécificité d'interaction avec FoxA (Figure 36B) (Chan *et al.*, 2023). Les mesures d'affinité indiquent que le site de liaison de FoxA présente une affinité plus faible pour la forme ferrique de la bisucabérine que pour celle du DFOB et de la NOCA (Chan *et al.*, 2023).



**Figure 36 :** Structure de la bisucabérine. **A.** Structure chimique de la bisucabérine où les groupes chélateurs de type hydroxamate sont représentés en orange. **B.** Superposition des complexes ferri-NOCA (en orange) et ferri-bisucabérine (en bleu ciel) (Adapté de Chan *et al.*, 2023).

#### 2.2.2.2 Ferrichromes

Le ferrichrome (FRC) est un sidérophore synthétisé par de nombreuses espèces fongiques, dont *Ustilago*, *Aspergillus* et *Penicillium* (Varma and Chincholkar, 2007). Il s'agit d'un hexapeptide cyclique constitué de trois résidus de glycine et de trois résidus N-hydroxyornithyl acylés, dont les groupements hydroxamates assurent la chélation de l'ion Fe<sup>3+</sup>. La modification des résidus d'ornithine et l'ajout de groupements additionnels au niveau du macrocycle conduisent à la formation de dérivés du FRC, tels que la ferrichrysine (CHRY), la ferricrocine (FCR), la ferrirhodine et la ferrirubine (Figure 37). Outre le FRC, seuls les sidérophores CHRY et FCR seraient utilisés par *P. aeruginosa* pour accéder au fer par un mécanisme qui reste à ce jour non élucidé (Meyer, 1992).

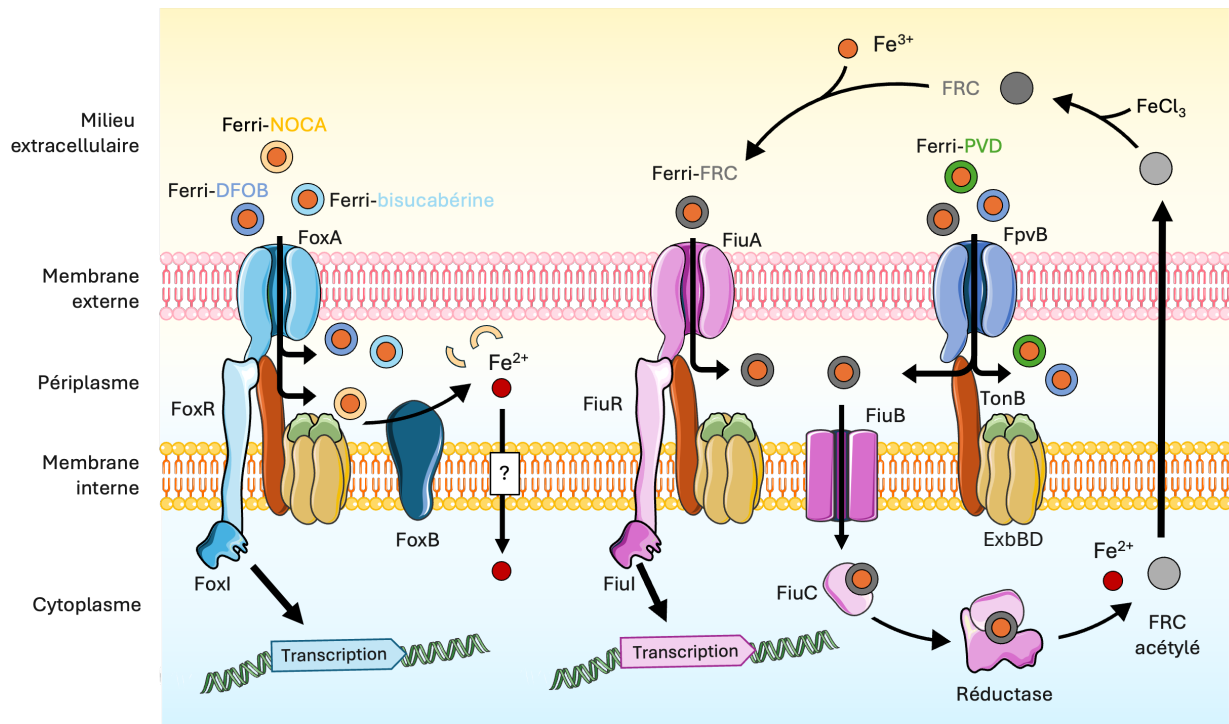


Sidérophore	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ferrichrome	H	H	H
Ferricrocine	CH <sub>2</sub> OH	H	H
Ferrichrysine	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	H
Ferrirhodine (Z) Ferrirubine (E)	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	CH-C(CH <sub>3</sub> )- CH <sub>2</sub> OH

Figure 37 : Structure chimique des sidérophores de la famille des ferrichromes. Les groupements de type hydroxamate sont représentés en orange et les radicaux variables sont représentés en rouge.

Chez *P. aeruginosa*, le transport des complexes ferri-FRC vers le périplasma est assuré par les TBDTs FiuA et FpvB (Figure 38) (Llamas *et al.*, 2006; Chan and Burrows, 2022). FpvB est donc un transporteur atypique capable de reconnaître des ligands de structures distinctes comme la PVD, le DFOB et le FRC, avec des affinités et des modes de liaisons différents (Chan and Burrows, 2022). Le fer ne se dissocie pas du FRC dans le périplasma mais dans le cytoplasme de la bactérie.

Le passage du complexe ferri-FRC à travers la membrane interne est assuré par la perméase FiuB, codée par un gène situé en aval de *fiuA*. Dans le cytoplasme, la libération du fer du FRC nécessite la réduction du fer ferrique en fer ferreux, couplée à une modification chimique du sidérophore (Hannauer *et al.*, 2010). À ce jour, seule la protéine FiuC, une N-acyltransférase cytoplasmique dont le gène est également adjacent à *fiuA*, a été identifiée comme étant impliquée dans l'acylation des groupements chélateurs du FRC, réduisant ainsi leur affinité pour le fer (Hannauer *et al.*, 2010). Le FRC acétylé est ensuite recyclé et relargué dans le milieu extracellulaire par un mécanisme d'efflux qui demeure à ce jour non identifié. Dans le milieu extracellulaire, les chlorures de fer peuvent hydrolyser les groupements acétylés du FRC qui seront à nouveau capables de chélater l'ion Fe<sup>3+</sup>. Le complexe ferri-FRC formé pourra à nouveau être utilisé par *P. aeruginosa* pour accéder au fer (Figure 38) (Hannauer *et al.*, 2010).



**Figure 38 :** Voie d'acquisition du fer par les sidérophores de type hydroxamate chez *P. aeruginosa*. NOCA : Nocardamine, FRC : Ferrichrome, DFOB : Desferrioxamine B et PVD : Pyoverdine 1, sidérophore endogène de *P. aeruginosa*.

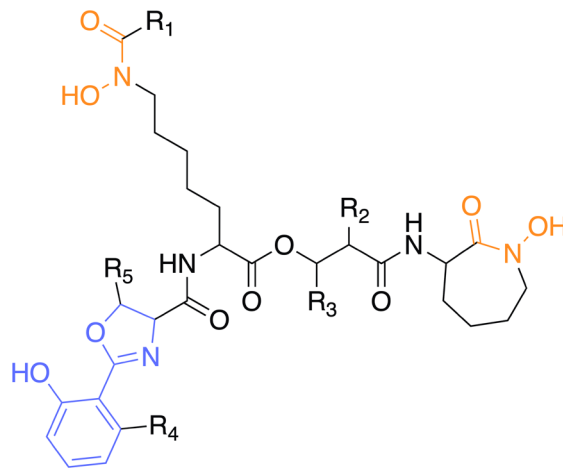
La régulation de la transcription de *fiuA* implique les ECF sigma/anti-sigma FiuI/FiuR (Figure 38). La liaison des complexes ferri-FRC à FiuA entraîne une interaction avec le domaine de signalisation de FoxA et le facteur anti-sigma FiuI, avec comme conséquence une dissociation du régulateur transcriptionnel FiuR de FiuI. La transcription et par conséquent leur expression est également régulée par Fur (Llamas *et al.*, 2006).

### 2.2.3 Import du fer par les sidérophores de type mixte

#### 2.2.3.1 Les mycobactines et carboxymycobactines

De nombreuses mycobactéries, comme *Mycobacterium smegmatis* ou encore *M. tuberculosis*, produisent deux formes de sidérophores dérivés du salicylate, appelés mycobactine (MYCO) et carboxymycobactine (CarbMYCO). Il s'agit de sidérophores mixtes qui présentent deux groupements hydroxamates et un groupement 2-hydroxyphenyl-oxazoline impliqués dans la liaison avec l'ion ferrique. Ces sidérophores sont particuliers car ils sont sécrétés par les mycobactéries sous forme d'un mélange de molécules qui se distinguent par la longueur, la position et la composition de la chaîne alkyl. La présence d'un groupement acide carboxylique (ou ester) à l'extrémité de la chaîne alkyl de la CarbMYCO rend la molécule plus polaire que la MYCO (Figure 39). La MYCO est

localisée principalement à la surface de la cellule des mycobactéries, alors que la CarbMYCO sera excrétée dans l'environnement pour y chélater le fer (Ratledge and Ewing, 1996; De Voss *et al.*, 1999). *M. smegmatis* produit également un second sidérophore sécrété dans l'environnement bactérien, l'exochéline, mais qui ne semble pas utilisable par *P. aeruginosa* pour accéder au fer (Ratledge and Ewing, 1996; Llamas *et al.*, 2008).



**Figure 39 :** Structure générale de la mycobactine et de la carboxymycobactine. Les fonctions chélatrices sont représentées en couleur avec en orange, la fonction hydroxamate et en violet, le groupement 2-hydroxyphenyl-oxazoline. Les positions R1 à R5 peuvent être remplacées par des chaînes grasses.

Chez *P. aeruginosa*, l'import de la ferri-MYCO et la ferri-CarbMYCO est assuré en grande partie par le TBDT FemA, mais au moins un autre TBDT serait impliqué dans le transport de ces sidérophores chez *P. aeruginosa* (Figure 40) (Llamas *et al.*, 2008). Le gène *femA* est organisé en opéron avec le gène PA1909 codant pour une protéine de la membrane cytoplasmique de type réductase. PA1909 est de plus prédit comme étant un homologue des réductases FpvG et FoxB, impliquées respectivement dans la dissociation du fer de la PVD et la NOCA où *foxB* est également situé en amont du gène codant pour le TBDT associé, *FoxA*. PA1909 pourrait ainsi réduire le fer ferrique en fer ferreux, permettant sa dissociation du sidérophore. De plus, on retrouve en amont de cet opéron le gène PA1908 qui code pour un transporteur de membrane interne de type MFS (pour major facilitator superfamily) qui pourrait ainsi être impliqué dans le transport des ions ferreux à travers la membrane interne.

La transcription de *femA* implique le système de type sigma/anti-sigma FemI/FemR où *femI* et *femR* sont localisés en aval de *femA*. La disposition en opéron des gènes PA1909 et *femA* indique que le système FemI/FemR pourrait, en plus de *femA*, réguler la transcription de PA1909 (Figure 22) (Llamas *et al.*, 2008). La transcription de la voie est également régulée par Fur.

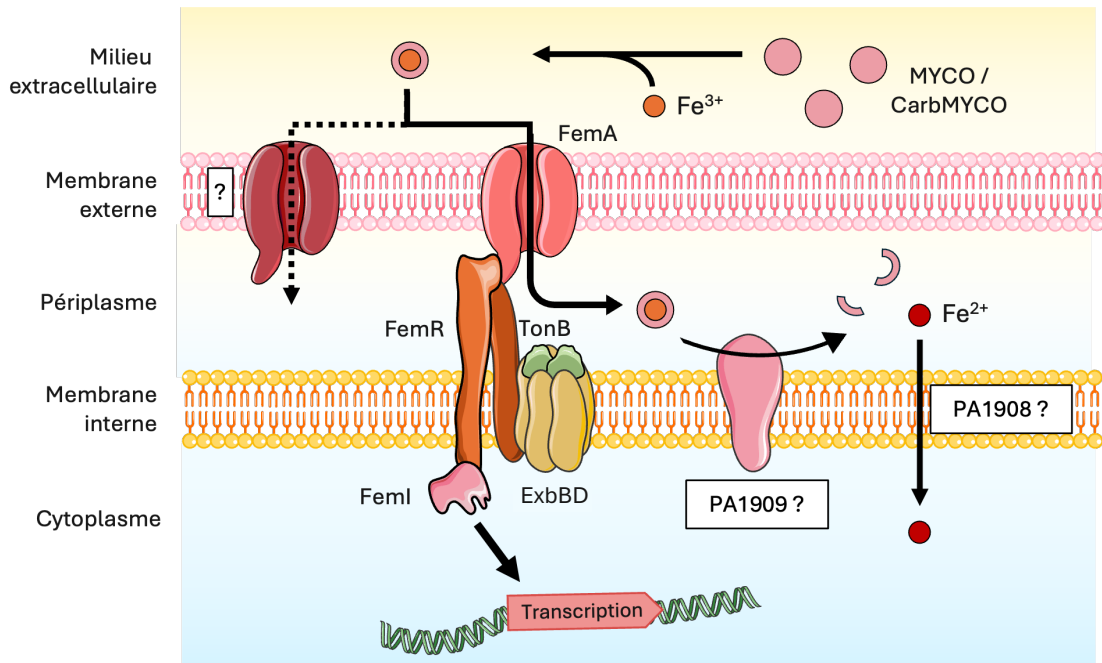
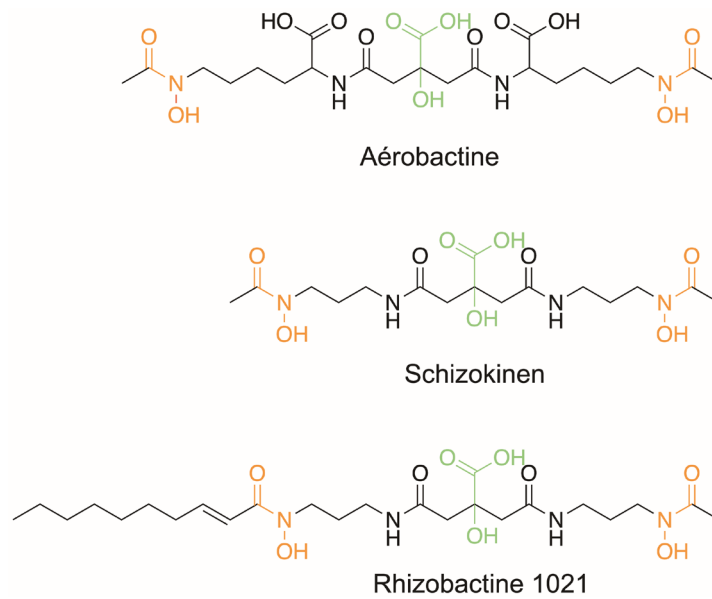


Figure 40 : Voie d'import du fer par les mycobactines (MYCO, CarbMYCO) chez *P. aeruginosa*. Les protéines jouant un rôle hypothétique dans la voie sont encadrées en blanc.

### 2.2.3.2 Sidérophores de type hydroxycarboxylate/hydroxamate

L'aérobactine (AERO), la rhizobactine et la schizokine (SCHIZO) sont des sidérophores mixtes de type hydroxycarboxylate/hydroxamate synthétisés par des espèces microbiennes retrouvées dans la rhizosphère mais également en infection. L'AERO est synthétisée par des entérobactéries telles que *E. coli* et par des souches hypervirulentes de *Klebsiella pneumoniae*. La rhizobactine est produite par des *Rhizobium* tels que *Sinorhizobium meliloti*, et la SCHIZO est également produite par des *Rhizobium* mais aussi par *Bacillus megaterium*. Ces sidérophores, de structure très proche, se caractérisent par la présence de deux groupements hydroxamates et d'un groupement  $\alpha$ -hydroxycarboxylate permettant de lier l'ion ferrique (Figure 41) (Gibson and Magrath, 1969; Mullis *et al.*, 1971; Persmark *et al.*, 2002).





**Figure 41:** Structure chimique des sidérophores mixtes citrates/hydroxamates. Les groupements hydroxamates sont représentés en orange et les groupements  $\alpha$ -hydroxycarboxylates sont représentés en verts.

Ces sidérophores importent le fer chez *P. aeruginosa* par le TBDT ChtA. Il est important de noter que ChtA possède de grandes similarités avec le TBDT IutA de *E. coli*, qui est également impliqué dans l'import du fer par la rhizobactine et la SCHIZO (Ó Cuív *et al.*, 2004; Cuív *et al.*, 2006). À ce jour, les mécanismes moléculaires impliqués dans la dissociation du sidérophore du fer et sa localisation restent méconnus. Toutefois, il a été hypothétisé que FoxB jouerait un rôle dans la réduction du complexe ferri-SCHIZO au niveau de la membrane interne, par le biais d'un mécanisme redondant (Cuív *et al.*, 2007). Enfin, l'expression de ChtA est uniquement régulée par la carence en fer *via* Fur (Cuív *et al.*, 2006).

## 2.3 Autres voies d'import du fer chez *P. aeruginosa*

### 2.3.1 Voie d'import du fer par le citrate

Le citrate est un produit du cycle de Krebs obtenu par condensation de l'oxaloacétate et de l'acétyl-CoA par le citrate synthase. Outre ses propriétés métaboliques, le citrate se caractérise également par sa capacité à lier les ions ferriques avec différentes stœchiométries qui vont être retrouvées en équilibre dans l'environnement bactérien. Une molécule d'eau peut également intervenir dans la chélation de l'ion ferrique par le citrate afin de stabiliser cette liaison. Chez *E. coli*, la résolution de la



structure cristallographique de FecA a révélé une stœchiométrie 2 : 2 pour la chélation du fer par le citrate (Figure 42B) (Ferguson *et al.*, 2002).

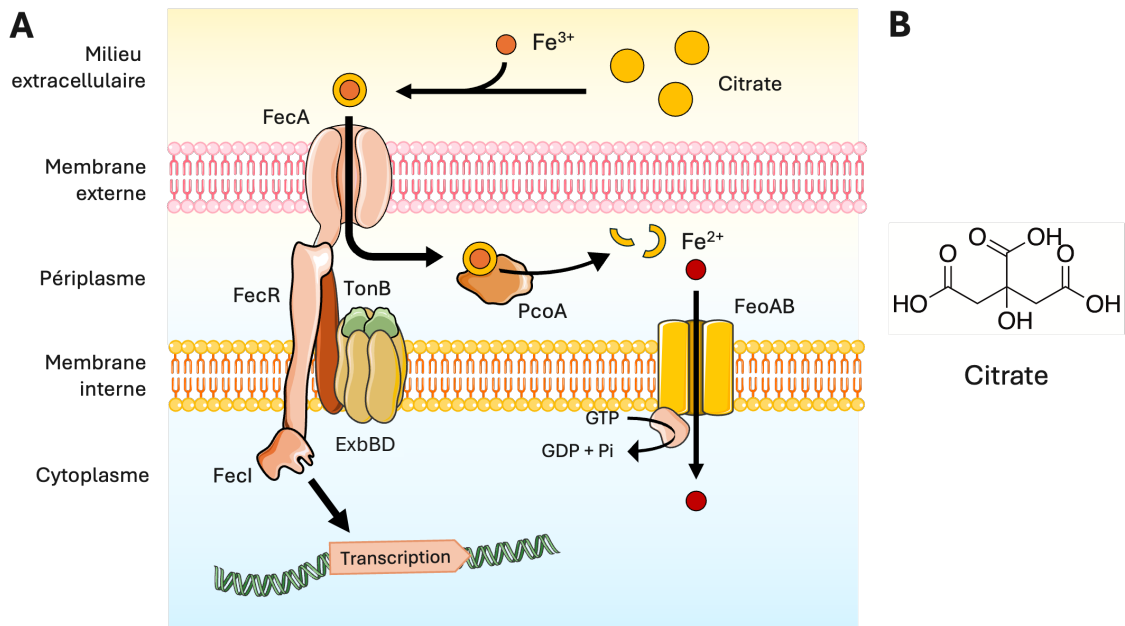


Figure 42 : Voie d'import du fer par le citrate chez *P. aeruginosa*. (A) Voie d'acquisition du ferri-citrate. (B) Structure chimique du citrate.

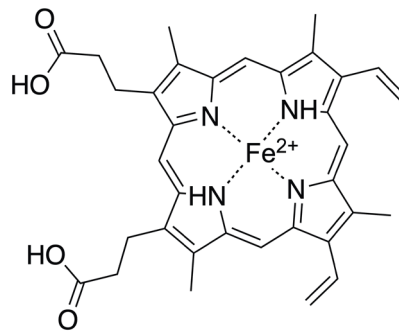
Les premières observations sur l'utilisation du citrate par *P. aeruginosa* remontent à 1980 (Cox, 1980). Toutefois, il a fallu près de trente ans pour mettre en évidence que les complexes ferri-citrate étaient importés à travers la membrane externe par le TBDT FecA (Figure 42A) (Marshall *et al.*, 2008). À ce jour, aucune donnée expérimentale ne permet de conclure que la forme dicitrate-ferrique est celle reconnue par FecA chez *P. aeruginosa*.

Dans le périplasm, il est supposé que le complexe ferri-citrate soit dissocié par la ferredoxine périplasmique PcoA par réduction du fer ferrique en fer ferreux. Les ions ferreux sont ensuite pris en charge par le système FeoAB qui est un transporteur GTP dépendant et qui permet le passage actif des ions ferreux à travers la membrane interne (Figure 26B) (Marshall *et al.*, 2008). L'expression de *fecA* est régulée par la présence de citrate ferrique et le facteur ECF sigma FecI et anti-sigma FecR. Les deux gènes codant pour ces protéines sont localisés en amont de *fecA* et leur transcription est régulée par Fur (Banin *et al.*, 2005; Llamas *et al.*, 2008).

### 2.3.2 Voies d'import de l'hème

L'hème est la principale source de fer en infection et se compose d'une porphyrine chélatant l'ion ferreux (Figure 43). *P. aeruginosa* possède trois systèmes impliqués dans son acquisition : le système

Phu (Pseudomonas heme uptake), le système Has (Heme-assimilation system) et le système Hxu (**Figure 44**) (Smith and Wilks, 2015; Otero-Asman *et al.*, 2019; Normant *et al.*, 2021).



**Figure 43** : Structure de l'hème B

Le système **Phu** assure l'import de l'hème libre *via* le TBDT PhuR. Dans le périplasme, l'hème se lie à la protéine périplasmique PhuT, qui le transfère au transporteur ABC PhuUV, permettant son import à travers la membrane interne (Ochsner *et al.*, 2000). Dans le cytoplasme, l'hème est pris en charge par la chaperonne PhuS, qui va interagir avec l'hème oxygénase HemO. Cette enzyme dégrade l'hème en biliverdine et monoxyde de carbone, libérant ainsi le fer ferreux (**Figure 44**) (Ochsner *et al.*, 2000; Mouriño *et al.*, 2016). Une seconde hème oxygénase, BphO a également été identifiée chez *P. aeruginosa*, mais intervient uniquement dans la dégradation de l'hème endogène (Barker *et al.*, 2012). En l'absence d'hème, PhuS réprime la transcription des sRNA PrrF1 et PrrH (Hoang *et al.*, 2023). La régulation du système Phu est uniquement dépendante de Fur, en réponse à la disponibilité intracellulaire en fer.

Le système **Has** repose sur la synthèse d'un hémophore, HasAp, sécrété dans l'environnement par le système d'efflux HasDE-OpmM (Yukl *et al.*, 2010). HasAp possède une forte affinité pour l'hème qu'il extrait des hémoprotéines de l'hôte. Une fois lié à l'hème, HasAp interagit avec HasR et l'hème migre de son site de liaison de HasA au site de liaison de HasR pour ensuite être importé dans le périplasme (Centola *et al.*, 2020). Dans le périplasme, l'hème est également pris en charge par PhuT et transporté à travers la membrane plasmique par PhuUV (**Figure 44**) (Smith and Wilks, 2015). L'expression des protéines du système Has est régulée par Fur et par le système ECF sigma/anti-sigma HasI/HasS qui induit la transcription de *hasR* et *hasA* en réponse à la présence d'hème (Dent *et al.*, 2019).

Enfin, le système Hxu intervient dans l'acquisition de l'hème *via* le TBDT HxuA, uniquement lorsque les concentrations d'hèmes sont élevées (Figure 44). La transcription de *hxuA* est régulée par un ECF sigma HxuI et un facteur anti-sigma HxuR (Otero-Asman *et al.*, 2019). Toutefois, le système Hxu semble davantage jouer un rôle dans la signalisation que dans l'acquisition de l'hème, puisqu'il active la transcription de gènes impliqués dans la virulence en réponse à la présence d'hème (Otero-Asman *et al.*, 2019; Sánchez-Jiménez, Marcos-Torres, *et al.*, 2023).

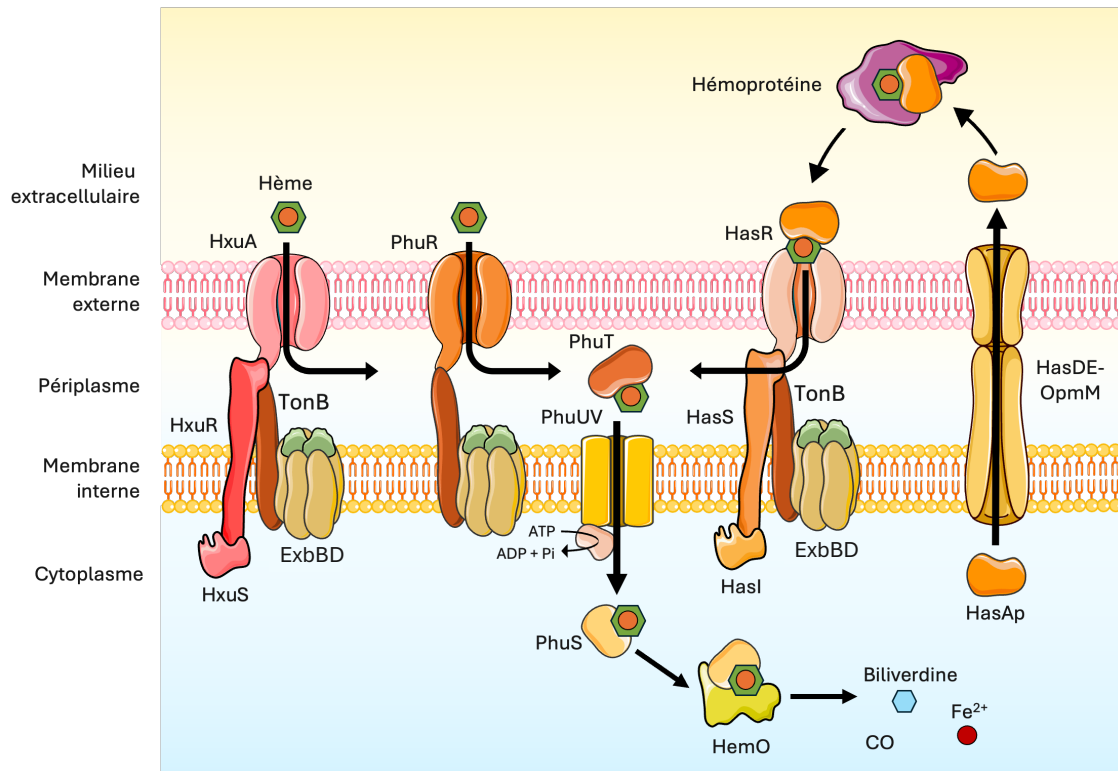


Figure 44 : Voies d'acquisition de l'hème chez *P. aeruginosa*.

### 2.3.3 Voie du *Pseudomonas* quinolone signal (PQS)

En plus de son rôle de signalisation dans le QS, la molécule PQS (*Pseudomonas* quinolone system) joue un rôle majeur dans l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa*. Le PQS induit l'expression des voies de biosynthèse des sidérophores endogènes et participe directement à l'acquisition du fer grâce à ses propriétés chélatrices. Il forme en effet un complexe stable avec l'ion ferrique selon une stœchiométrie de 3 : 1 (PQS :  $Fe^{3+}$ ) (Bredenbruch *et al.*, 2006). En condition de carence en fer, les molécules de PQS sont sécrétées dans l'environnement bactérien. En raison de leur hydrophobicité, elles s'accumulent dans la membrane externe des bactéries, ce qui provoque une courbure membranaire favorisant la formation de vésicules appelées OMVs (Outer Membrane Vesicule) (Lin

*et al.*, 2018). Il est estimé que plus de 60% du PQS produit par *P. aeruginosa* s'accumule au niveau de la membrane externe (Diggle *et al.*, 2007). Une fois encapsulées dans ces vésicules, les molécules de PQS chélatent les ions ferriques présents dans l'environnement (Figure 45) (Lin *et al.*, 2018).

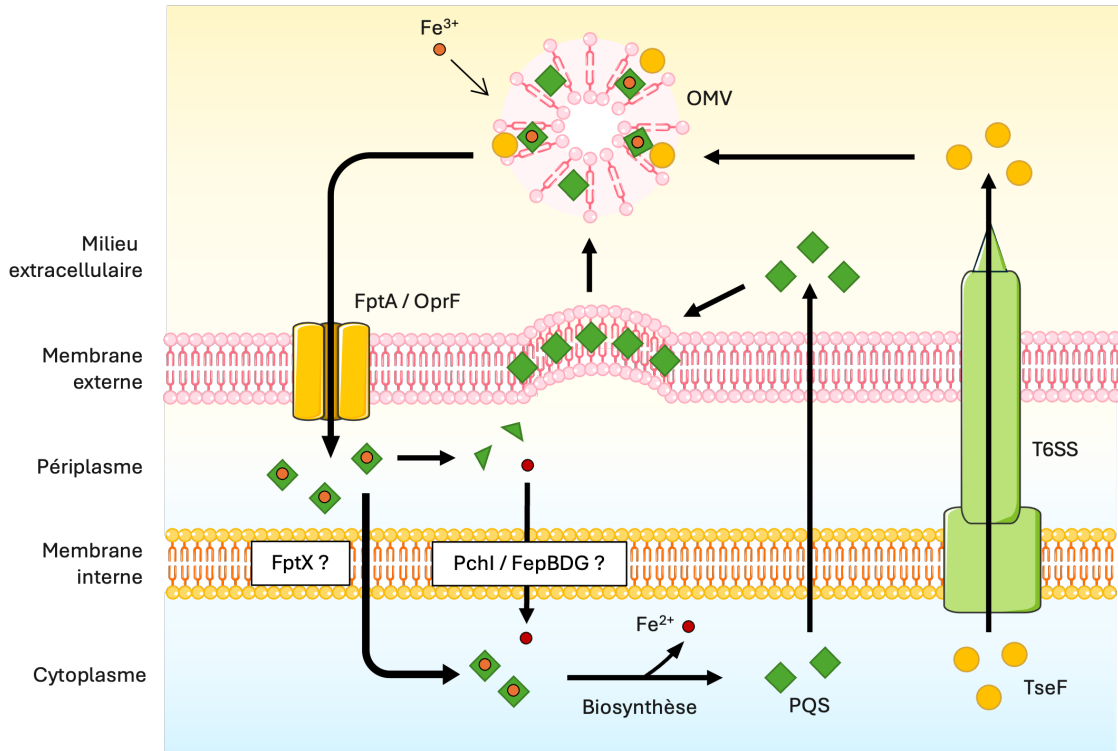
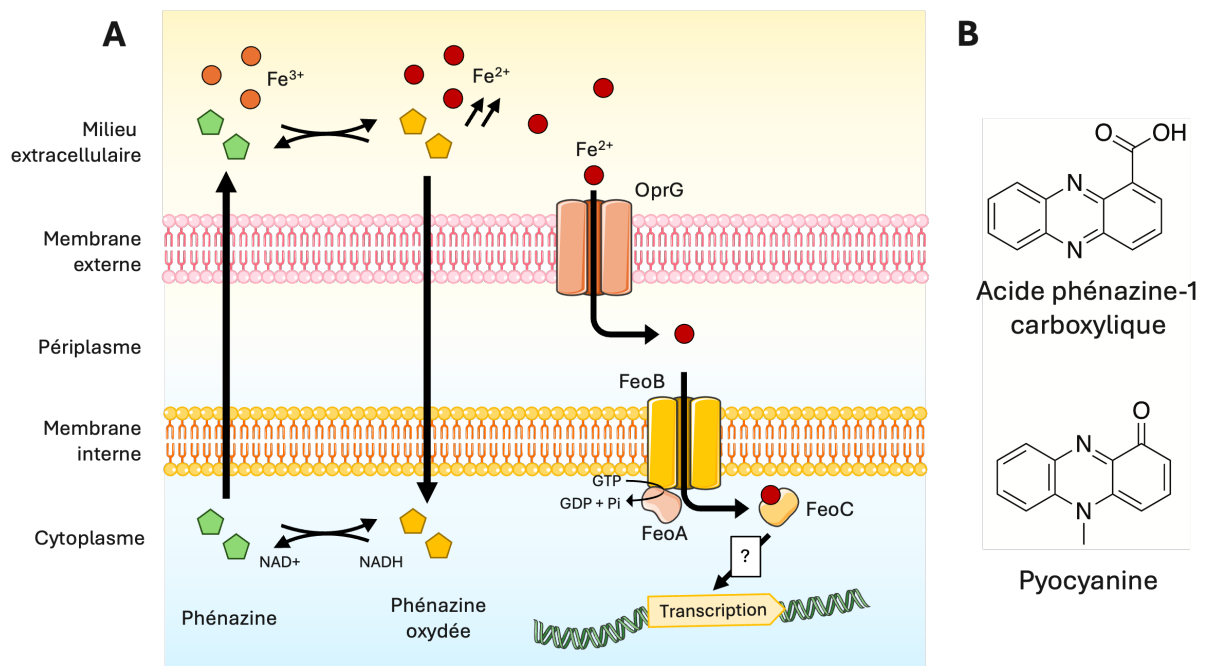


Figure 45 : Voie d'acquisition du ferri-PQS chez *P. aeruginosa*. Les protéines jouant un rôle hypothétique dans la voie sont encadrées en blanc.

En complément de ce mécanisme, *P. aeruginosa* sécrète la protéine TseF (PA2374), via son système de sécrétion de type 6 (T6SS). TseF se lie aux complexes ferri-PQS formés sur les OMVs et les adresse à la membrane externe bactérienne. TseF joue également un rôle clé dans le relargage de ces complexes au niveau de la membrane externe, où ils lient la porine OprF et le TBDT FptA, permettant leur passage à travers la membrane externe (Lin *et al.*, 2017). Le PQS partage ainsi le même transporteur que la PCH, et sa présence induit la biosynthèse de cette dernière chez *P. aeruginosa*, indiquant un lien étroit entre ces deux systèmes (Ma *et al.*, 2024). De récentes données suggèrent que, tout comme la PCH, une partie des complexes ferri-PQS traverse la membrane interne via FptX, tandis que l'autre est dissociée dans le périplasm. Dans ce cas, le transport du fer ferreux à travers la membrane interne impliquerait Pchl et le système *fep* (Figure 45) (Zhang *et al.*, 2024).

### 2.3.4 Voie du fer ferreux

Contrairement au fer ferrique, le fer ferreux est soluble en milieu aqueux et prédomine dans les environnements hypoxiques et à faible pH, comme dans le cas d'infections respiratoires associées à la fibrose kystique (CF). Chez *P. aeruginosa*, les ions  $\text{Fe}^{2+}$ , étant plus solubles que les ions  $\text{Fe}^{3+}$ , ils diffusent à travers la membrane externe *via* des porines. L'un des potentiels candidats est la porine OprG, appartenant à la famille des porines OmpW, dont l'expression est induite en présence de fer et en conditions anaérobies. Chez *Acinetobacter baumannii*, il a été démontré que OmpW, un homologue de OprG, est impliqué dans l'import des ions  $\text{Fe}^{2+}$  (Catel-Ferreira *et al.*, 2016; Chevalier *et al.*, 2017). Après leur passage dans le périplasma, les ions ferreux seront pris en charge par le système FeoABC où la protéine membranaire FeoB va permettre leur transport à travers la membrane interne par un mécanisme GTP-dépendant (Figure 46A) (Marshall *et al.*, 2008). FeoC, pourrait intervenir comme répresseur transcriptionnel accessoire du système Feo, bien que ce mécanisme reste encore à préciser chez *P. aeruginosa* (Lau *et al.*, 2016).



**Figure 46 :** Voie d'acquisition du fer ferreux chez *P. aeruginosa*. **A.** Import du fer ferreux. La sécrétion de phénazines augmente la concentration en ions  $\text{Fe}^{2+}$  dans l'environnement par réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  insolubles. **B.** Structure chimique des phénazines synthétisées par *P. aeruginosa*.

Chez *P. aeruginosa*, l'import du fer ferreux est favorisé par la production de phénazines, telles que la pyocyanine et la phénazine-1 acide carboxylique (PCA) (Figure 46B). Grâce à leurs propriétés rédox, ces molécules réduisent le fer ferrique complexé aux protéines de l'hôte en fer ferreux, le rendant

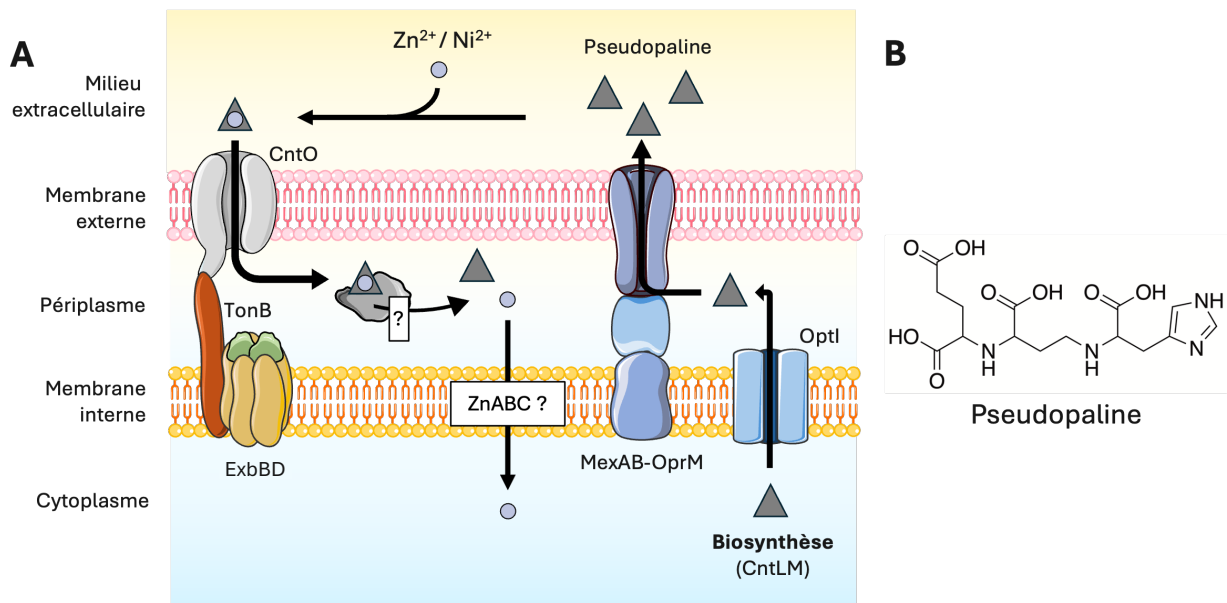
accessible aux bactéries (Figure 46A) (Wang *et al.*, 2011; Cornelis and Dingemans, 2013). De plus, certaines catécholamines, notamment la L-dopamine, possèdent également des propriétés oxydatives capables de réduire le fer ferrique en fer ferreux (Perraud, Kuhn, *et al.*, 2020).

## 2.4 Import d'autres métaux biologiques chez *P. aeruginosa*

### 2.4.1 Import du zinc

En plus des voies d'acquisition du fer, *P. aeruginosa* possède 4 TBDTs impliqués dans l'acquisition du zinc, un autre métal essentiel à sa croissance. Les TBDTs ZnuD, CirA et PA2911 assurent l'import du  $Zn^{2+}$  libre, tandis que CntO est impliqué dans l'import de la pseudopaline-Zn (Pederick *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* produit en effet le métallophore pseudopaline, qui permet l'acquisition du zinc et du cobalt en réponse aux conditions environnementales (Lhospice *et al.*, 2017; Mastropasqua *et al.*, 2017). Il s'agit d'une opine de structure apparentée aux nicotianamines végétales et qui appartient à une famille de métallophores bactériens à large spectre incluant la staphylopine (*Staphylococcus aureus*), la yersiniopine (*Yersinia pestis*) et la bacillopaline (*Paenibacillus mucilaginosus*) (Figure 47B) (Ghssein *et al.*, 2016; Lhospice *et al.*, 2017; Mastropasqua *et al.*, 2017; McFarlane *et al.*, 2018; Laffont *et al.*, 2019).

La biosynthèse de la pseudopaline est réalisée dans le cytoplasme à partir de L-histidine liée à une alpha-cétoglutarate par les enzymes CntL et CntM (Lhospice *et al.*, 2017; Mastropasqua *et al.*, 2017). Elle est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire en deux étapes : d'abord par CntI à travers la membrane interne, puis par la pompe à efflux MexAB-OprM (McFarlane *et al.*, 2018; Gomez *et al.*, 2021). La pseudopaline chélate ensuite les ions  $Zn^{2+}$  ou  $Ni^{2+}$  et les complexes formés sont internalisés dans le périplasme *via* CntO (Lhospice *et al.*, 2017; Mastropasqua *et al.*, 2017). Dans le périplasme, la pseudopaline est probablement modifiée ou dégradée, libérant ainsi le métal. Celui-ci pourra alors être internalisé dans le cytoplasme par le transporteur d'ions  $Zn^{2+}$  appelé ZnuAB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> (Figure 47A) (D'Orazio *et al.*, 2015; Gomez *et al.*, 2021). L'ensemble de cette voie est régulée par Zur (Zinc uptake regulator), un régulateur transcriptionnel de la famille Fur, qui assure une régulation globale de l'homéostasie du zinc chez *P. aeruginosa*, en réponse à sa concentration intracellulaire (Pederick *et al.*, 2015; Ducret *et al.*, 2023).



**Figure 47 :** Voie d'acquisition du Zn par la pseudopaline chez *P. aeruginosa*. **A.** Voie de biosynthèse, de sécrétion et d'import de la pseudopaline complexée au zinc ou au nickel avec une dissociation probable du métal de la pseudopaline dans le périplasm. Les protéines jouant un rôle hypothétique dans la voie sont encadrées en blanc. **B.** Structure chimique de la pseudopaline.

#### 2.4.2 Import du cobalt et du cuivre

*P. aeruginosa* possède deux TBDTs impliqués respectivement dans l'acquisition du cobalt et du cuivre. La cobalamine (ou vitamine B12) constituée d'un noyau corrine coordonnant un atome de cobalt, peut être utilisée par les bactéries comme source de cobalt. Chez *P. aeruginosa*, le transporteur BtuB est présumé assurer le passage de la cobalamine à travers la membrane externe. Cette hypothèse repose sur sa forte homologie avec le transporteur BtuB d'*E. coli*, dont le rôle dans l'import de la cobalamine est bien caractérisé (Gudmundsdottir *et al.*, 1989; Cadieux *et al.*, 2003; Chimento *et al.*, 2003). Par ailleurs, le gène *btuB* est localisé au sein d'un opéron impliqué dans la biosynthèse de la cobalamine, suggérant son implication fonctionnelle dans son transport à travers la membrane externe.

Concernant l'acquisition du cuivre, les ions Cu (I) et Cu (II) sont importés à travers la membrane externe par OprC (Yoneyama and Nakae, 1996; Bhamidimarri *et al.*, 2021). En condition de carence en cuivre, *P. aeruginosa* sécrète *via* son système de sécrétion de type VI, la protéine azurine, capable de chélater les ions Cu<sup>2+</sup> dans l'environnement bactérien (Han *et al.*, 2019). Des expériences *in vivo* de co-immunoprécipitation (Co-IP) montrent une interaction spécifique entre l'azurine et OprC, facilitant ainsi l'acquisition du cuivre en conditions de carence en métaux (Han *et al.*, 2019).



L'homéostasie du cuivre est régulée par le facteur transcriptionnel CueR en réponse aux concentrations intracellulaires en cuivre (Han *et al.*, 2019).

### 3 L'importance du fer lors de la croissance de *P. aeruginosa* en biofilm

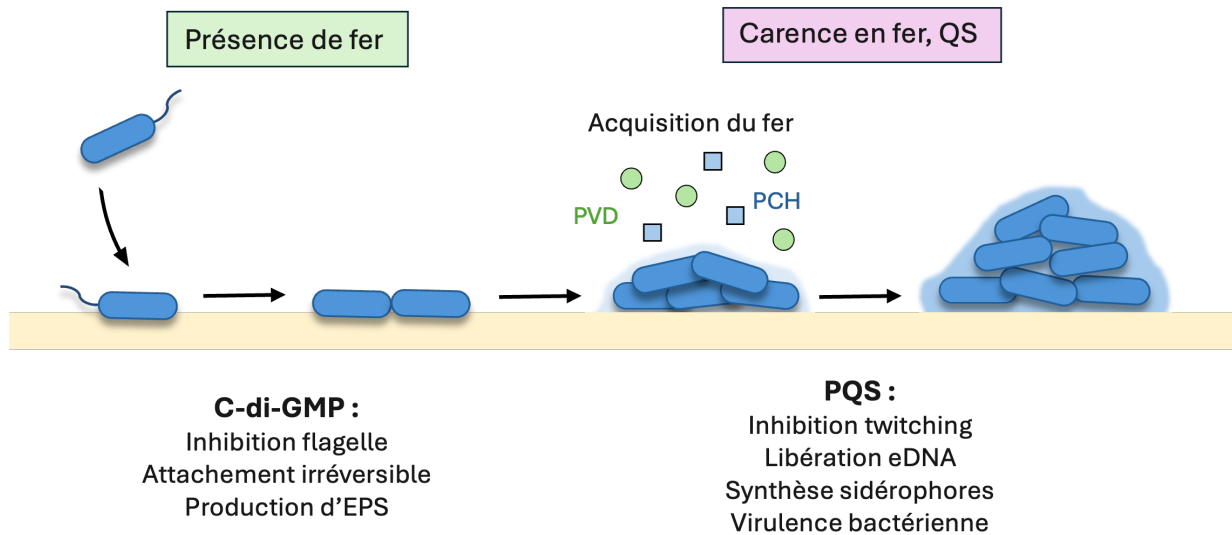
Dans les années 2000, des études préliminaires réalisées sur le biofilm de *P. aeruginosa* ont permis de démontrer le rôle essentiel du fer dans la formation et le maintien du biofilm chez l'hôte. En 2002, Pradeep K. Singh et ses collaborateurs ont démontré qu'une carence en fer dans l'environnement bactérien inhibe la formation de biofilm chez l'hôte. La carence en fer a été mimée par l'ajout de fortes concentrations en lactoferrine qui vont chélater l'ensemble du fer présent dans l'environnement. L'ajout de lactoferrine a alors conduit à la restauration de la mobilité de type twitching chez *P. aeruginosa*, mais aussi à la formation d'un biofilm en fine couche et non en forme de champignon caractéristique (Singh *et al.*, 2002). Cet effet a également été observé en présence d'EDTA, un chélateur de métaux, dont l'ajout déstabilise la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Banin *et al.*, 2006). Une forte concentration en fer dans l'environnement de la bactérie va également conduire à la formation d'un biofilm plat chez *P. aeruginosa* plutôt qu'un biofilm en forme de champignon (Musk *et al.*, 2005), démontrant que des concentrations adéquates en fer sont nécessaires pour stabiliser les premières étapes de formation du biofilm et permettre ainsi la formation d'un biofilm hautement structuré chez *P. aeruginosa* (O'Toole and Kolter, 1998), et empêchant vraisemblablement l'installation de la bactérie dans des environnements pauvres en fer et donc défavorables à sa croissance (Figure 48) (Singh *et al.*, 2002; Musk *et al.*, 2005).

La quantité en fer présente dans l'environnement bactérien influence en effet la formation du biofilm par le biais du PQS, comme décrit précédemment. La carence en fer va alors induire le système PQS et inhiber la production de rhamnolipides, qui promeut la mobilité de type twitching, et stimuler la libération d'eDNA, essentiel dans la structuration matricielle du biofilm (Yang *et al.*, 2007), mais aussi la biosynthèse des sidérophores endogènes (Figure 48) (Rampioni *et al.*, 2016). L'expression de la voie PVD joue en effet un rôle majeur dans l'initiation et le développement du biofilm chez l'hôte où sa présence est requise pour permettre la formation d'un biofilm hautement structuré en forme de champignon (Banin *et al.*, 2005). La PVD jouerait également un rôle dans



l'adsorption à une surface métallique retrouvée dans les environnements médicaux ou industriels en rendant le fer plus accessible aux bactéries (Upritchard *et al.*, 2007).

La concentration extracellulaire en fer va également réguler les niveaux intracellulaires en messenger secondaire c-di-GMP, le principal régulateur de la mobilité bactérienne et de la formation du biofilm chez *P. aeruginosa*. Le fer va en effet moduler l'interaction entre IsmP, la protéine de senseur du fer, et ImcA, la diguanylate cyclase (DGC), impliquées dans la régulation des taux intracellulaires en c-di-GMP. En présence de fer, le fer se lie à IsmP, ce qui inhibe son interaction avec ImcA, ce qui aura pour conséquence d'augmenter la synthèse de c-di-GMP *via* ImcA. L'augmentation intracellulaire en c-di-GMP va alors promouvoir la formation de biofilm en réduisant notamment la motilité bactérienne dépendante du flagelle (Figure 48) (Zhan *et al.*, 2024). L'hème joue également le rôle d'effecteur d'IsnP, ce qui signifie que son import dans la cellule va également conduire à l'augmentation du taux en c-di-GMP et conduire à la formation du biofilm chez *P. aeruginosa* (Zhan *et al.*, 2024).



**Figure 48 :** Le rôle du fer dans les premières étapes de formation du biofilm chez *P. aeruginosa*. Une concentration adéquate en fer est nécessaire pour l'activation du c-di-GMP et permettre une adhésion irréversible des bactéries à la surface et la production d'EPS. Le développement du biofilm s'accompagne d'une diminution du fer disponible, induisant le PQS et la biosynthèse des sidérophores endogènes en plus d'une augmentation de la virulence bactérienne.

Enfin, les constituants matriciels de l'EPS joueraient également un rôle clé dans la disponibilité du fer dans le biofilm. Les exopolysaccharides alginate, Pel et Psl seraient en effet capables de lier le fer

et permettre son stockage au sein du biofilm. Cependant, seul le rôle de Psl dans la liaison avec le fer ferrique et le fer ferreux a pour le moment été observé au sein du biofilm de *P. aeruginosa* (Yu *et al.*, 2016). Cette stratégie permettrait à la bactérie de séquestrer et stocker le fer extracellulaire via Psl, et ainsi favoriser la formation et la stabilité du biofilm (Yu *et al.*, 2016). Toutefois, des études additionnelles sont nécessaires pour comprendre ce mécanisme et son rôle dans l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa*.

# Chapitre V : Le fer dans les communautés microbiennes



Que ce soit dans un contexte infectieux ou environnemental, *P. aeruginosa* évolue toujours dans des milieux pauvres en fer et en présence d'autres microorganismes. Dans ce cadre, une coévolution des stratégies d'acquisition du fer s'est opérée, conduisant chaque organisme à développer des mécanismes spécifiques pour acquérir ce métal. Ce chapitre explorera les interactions de *P. aeruginosa* avec les différentes communautés microbiennes.

## 1 Généralités

Une communauté microbienne correspond à l'ensemble des espèces microbiennes (bactéries, archées, champignons, virus...) coexistant dans un même environnement et interagissant entre elles et avec leur habitat. Les conditions environnementales et la composition en espèces microbiennes influencent grandement sa structure et sa dynamique (Widder *et al.*, 2016). Dans ces environnements, le fer est peu biodisponible, ce qui est en fait une ressource à la fois essentielle à la croissance microbienne et hautement convoitée entre les organismes. Dans ce contexte, la majorité des espèces a développé des stratégies d'acquisition faisant intervenir des sidérophores. Ces molécules, bien que partageant une fonction commune, présentent une grande diversité de structures chimiques et se distinguent par leur affinité variable pour l'ion ferrique (Hider and Kong, 2010; Niehus *et al.*, 2017).

Au sein d'une communauté microbienne, l'accès au fer n'est pas équitablement réparti entre les différentes espèces, ce qui va conduire à une diversité d'interactions microbiennes, modulées principalement par leur stratégie d'acquisition du fer. Les interactions les plus fréquemment observées sont **compétitives**, où chaque microorganisme produit son sidérophore pour accéder au fer. Dans ce cas, l'espèce produisant le sidérophore avec la meilleure affinité pour l'ion ferrique domine, au détriment des autres (Niehus *et al.*, 2017). De plus, des interactions **opportunistes** peuvent être observées, où certaines espèces peuvent tirer profit des sidérophores produits par d'autres sans en produire elles-mêmes, dans une stratégie de « piratage du sidérophore » (Griffin *et al.*, 2004; Kümmerli *et al.*, 2009). On retrouve également des interactions **mutualistes** qui reposent sur un partage coopératif des sidérophores, bénéfique à l'ensemble des partenaires (Jurkevitch, Y. Hadar, *et al.*, 1992, 1992). Ainsi, plus un microorganisme possède des capacités à exploiter de nombreux xénosidérophores, plus il va pouvoir se maintenir dans la communauté microbienne.

## 2 Interactions compétitives entre *P. aeruginosa* et les espèces microbiennes de l'environnement

Dans le cadre d'interactions compétitives, la stratégie prédominante adoptée par les espèces au sein de la communauté microbienne repose sur la production de sidérophores possédant une forte affinité pour le fer ferrique. C'est le cas notamment de *P. aeruginosa* qui synthétise la PVD et dont l'affinité pour le fer ferrique est de  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  (Albrecht-Gary *et al.*, 1994). La PVD agit comme un compétiteur de fer et réduit drastiquement son accès aux microorganismes (Figure 49). En réponse, certaines espèces de *Burkholderia*, telles que *B. cepacia*, fréquemment retrouvées lors d'infections respiratoires, produisent l'ornibactine, un sidérophore non utilisable par *P. aeruginosa* pour accéder au fer (Figure 49). La sécrétion d'ornibactine réduit la disponibilité du fer dans l'environnement, induisant une réponse adaptative de *P. aeruginosa*, qui augmente l'expression des gènes impliqués dans la carence en fer, dont la production de sidérophores (Weaver and Kolter, 2004). La spécificité d'un sidérophore pour une espèce microbienne empêche alors toute exploitation opportuniste du sidérophore, renforçant la compétition entre espèces. Cette compétition sera alors dépendante de la vitesse et de la quantité de sidérophores produits par chaque espèce microbienne, de leur affinité pour le fer et de la capacité des différentes espèces microbiennes présentes à utiliser les sidérophores de l'environnement.

Un autre exemple intéressant de compétition concerne *S. aureus* et *P. aeruginosa*, deux pathogènes retrouvés fréquemment lors d'infections respiratoires. Dans ce contexte, en plus d'augmenter la carence en fer, la sécrétion de PVD et PCH par *P. aeruginosa* induisent la formation de ROS via l'activation de PqsA, délétère pour les cellules de *S. aureus*. La lyse cellulaire va permettre de libérer dans l'environnement le fer contenu dans les cellules de *S. aureus*, qui sera alors disponible pour maintenir la croissance de *P. aeruginosa* (Mashburn *et al.*, 2005; Briard *et al.*, 2019). En plus de la production de sidérophores, *P. aeruginosa* sécrète également des facteurs de virulence tels que la protéase LasA, qui lyse le peptidoglycane de *S. aureus*, et des rhamnolipides, qui activent la dispersion du biofilm de *S. aureus*. Toutefois, les co-infections à *S. aureus* et *P. aeruginosa* peuvent subsister, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Les deux espèces bactériennes occuperaient alors des niches distinctes et interagiraient principalement par compétition chimique (Fazli *et al.*, 2009). Cette co-habitation peut s'expliquer par la capacité de *S. aureus* à modifier

enzymatiquement la structure chimique du sidérophore PCH, permettant ainsi de la rendre inutilisable par *P. aeruginosa*. L'inactivation de la PCH passe par la production par *S. aureus* d'une méthyltransférase appelée Spm, dont l'expression est dépendante du fer (régulateur Fur). Sa production va permettre la méthylation de l'acide carboxylique de la PCH, nécessaire à la liaison du sidérophore avec l'ion ferrique et à la génération de ROS (Jenul *et al.*, 2023). La conversion de la PCH en pyochéline méthyl ester (PME) conduit à la diminution de la PCH dans l'environnement bactérien et à l'augmentation de la survie de *S. aureus* en co-infection (Figure 49) (Jenul *et al.*, 2023; Uzi-Gavrilov *et al.*, 2023).

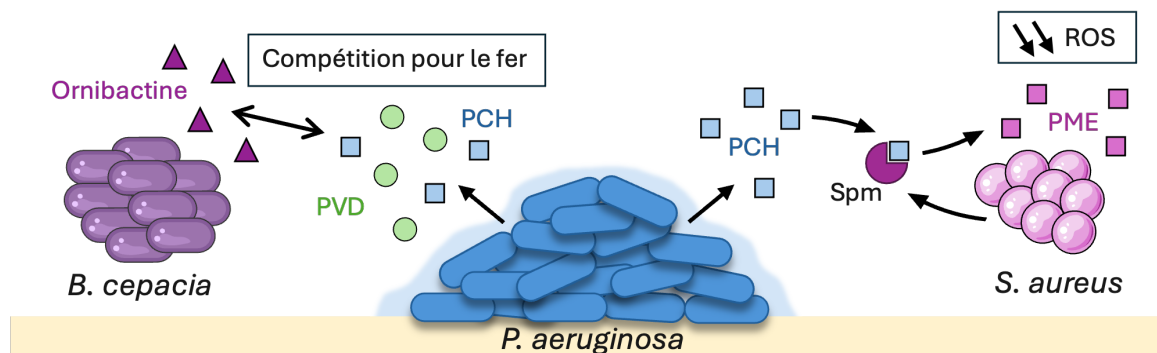


Figure 49 : Exemple d'interactions compétitives pour l'accès au fer entre les différentes espèces de la communauté microbienne. *P. aeruginosa* produit deux sidérophores, la PVD et la PCH, qui vont rentrer en compétition avec les xénosidérophores comme l'ornibactine pour le fer. En réponse, *S. aureus* produit une enzyme, Spm, qui va convertir la PCH en PCH méthyl ester (PME), inactive, permettant ainsi de réduire la quantité de ROS produite par les sidérophores de *P. aeruginosa*.

### 3 Cas de coopération pour l'accès au fer impliquant *P. aeruginosa*

Bien que les interactions entre les microorganismes au sein des communautés microbiennes soient majoritairement compétitives, des cas de coopération inter-règnes peuvent également se mettre en place entre *P. aeruginosa* et d'autres microorganismes, notamment avec certaines espèces de mycètes ou encore des Streptomyces. En effet, les sidérophores produits par ces espèces microbiennes, tels que le ferrichrome ou les desferrioxamines, pourront être utilisés par *P. aeruginosa* pour accéder au fer (Llamas *et al.*, 2006; Chan and Burrows, 2022). Cette capacité à exploiter des xénosidérophores constitue un avantage adaptatif qui s'explique par la taille du génome de *P. aeruginosa* et de sa capacité remarquable à moduler son métabolisme en réponse à

son environnement et favorise ainsi l'établissement d'interactions mutualistes où chaque partenaire bénéficie de l'augmentation de l'accès au fer (Loper and Henkels, 1999).

Un autre exemple concerne l'implantation durable de *P. aeruginosa* au sein de la communauté microbienne, une condition favorable à la colonisation secondaire d'*Aspergillus fumigatus*, un mycète fréquemment retrouvé dans les mêmes niches écologiques que *P. aeruginosa* (Nagano *et al.*, 2007; Sass *et al.*, 2019). Dans ce contexte, *P. aeruginosa* privilégie l'utilisation de l'hème et du fer ferreux comme sources de fer, au détriment de la production de PVD, favorisant le développement et le maintien de la croissance d'*A. fumigatus* (Ferreira *et al.*, 2015). Par ailleurs, les sidérophores produits par *A. fumigatus* vont également être exploités par *P. aeruginosa*, renforçant la coopération entre les deux organismes où chacun bénéficie d'un accès privilégié au fer (Sass *et al.*, 2019; Bastos *et al.*, 2022).

## 4 La lutte pour le fer, un enjeu central dans les infections humaines

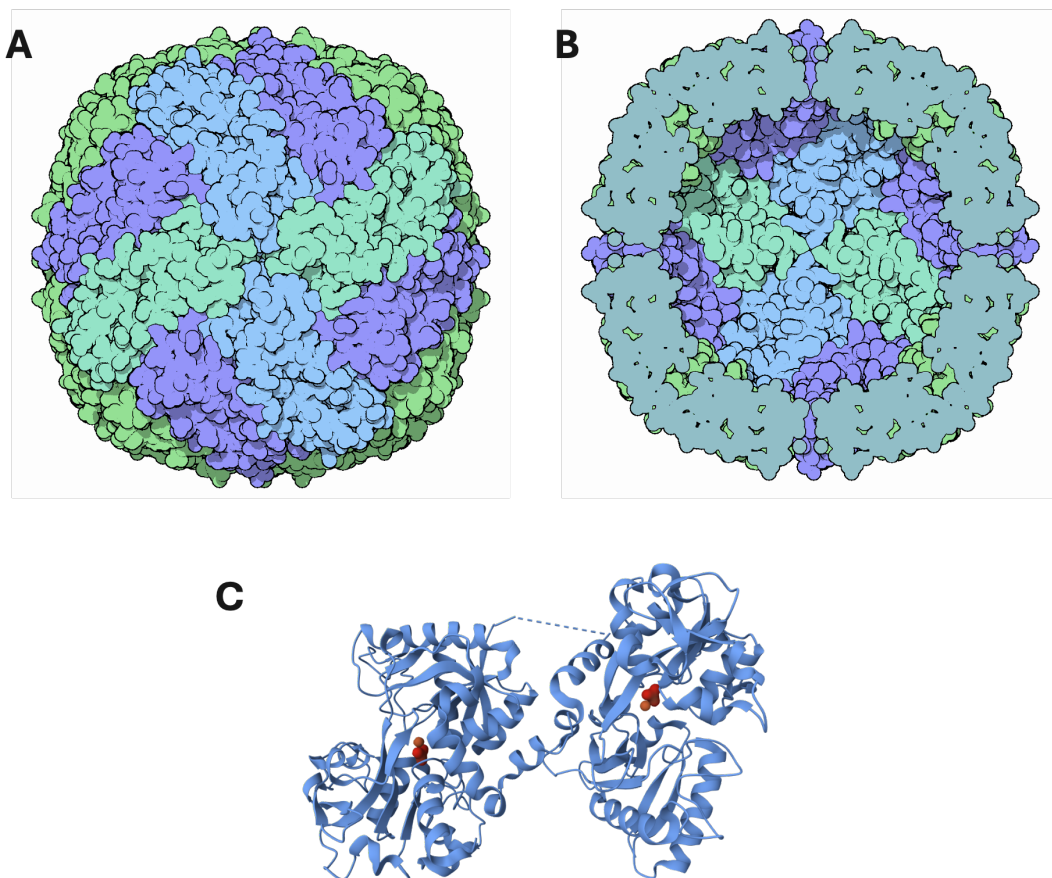
### 4.1 Immunité nutritionnelle

L'accès au fer en milieu biologique est un enjeu majeur pour les organismes vivants afin de répondre à leur besoin vital en fer. Au cours d'une infection, les vertébrés ont développé tout un arsenal pour séquestrer le fer et en limiter l'accès aux pathogènes pour éviter leur implantation dans l'hôte. Ce mécanisme de défense est appelé « immunité nutritionnelle » et implique deux types de stratégies : l'anémie inflammatoire (hepcidine) et la chélation du fer libre (transferrine, lactoferrine, ferritine) ou complexé au sidérophore (lipocaline).

L'anémie inflammatoire ou hypoferremie se traduit par l'augmentation du taux d'hepcidines circulantes, une enzyme produite majoritairement par les hépatocytes et dont le rôle est de réguler l'absorption du fer au niveau intestinal, mais aussi son stockage et sa libération dans le sang. L'augmentation du taux d'hepcidine conduit alors à l'endocytose de la ferroportine au niveau intestinal, et à la chélation du fer par les macrophages, réduisant ainsi l'absorption du fer vers la circulation sanguine (Domenico *et al.*, 2011). L'accès au fer sera également réduit au niveau



plasmatique, par la sécrétion de transferrines et de lactoferrines qui sont des glycoprotéines qui vont chélater le fer et qui possèdent également un rôle immunomodulateur (Figure 50C) (Drago-Serrano *et al.*, 2017). Au niveau intracellulaire, le fer disponible sera également réduit par la production de protéines de stockage du fer, les ferritines (Figure 50 A-B). La séquestration du fer aura pour effet de diminuer drastiquement la concentration en fer disponible dans le plasma, le sérum et sur les sites d'infection ( $10^{-24}$  M), un niveau bien inférieur aux concentrations requises pour la croissance bactérienne ( $10^{-5}$  à  $10^{-7}$  M) (Braun and Killmann, 1999). Cette restriction pour le fer aura pour effet de réduire considérablement l'implantation des bactéries au sein de l'hôte.



**Figure 50** : Structures des protéines de liaison au fer chez l'hôte. A. Structure du complexe ferritine composé de 24 sous-unités protéiques identiques (représentées en couleur) dont la cavité centrale (B) permet le stockage de près de 4500 ions ferriques (PDB 1FHA). C. Structure de la transferrine chélatant deux ions ferriques (en rouge) (PDB 1H76). Structures adaptées de « Molecule of the month #35 » par David Goodsel.

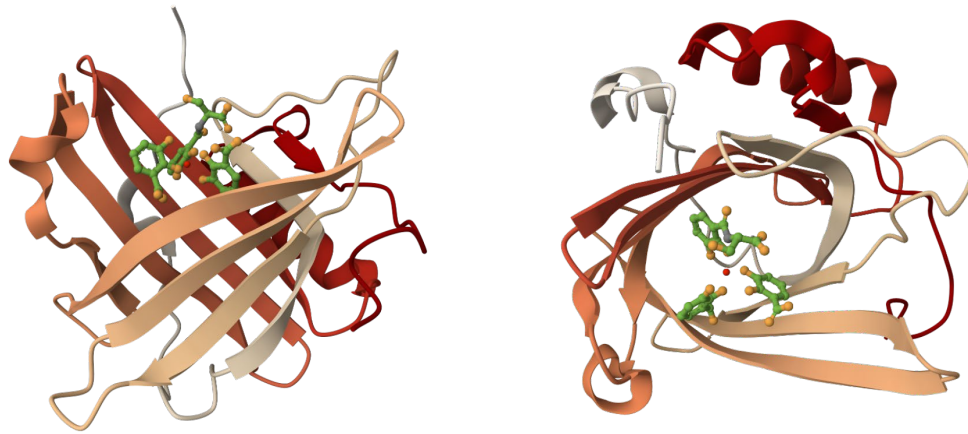
## 4.2 Acquisition du fer de l'hôte par les pathogènes

En réponse à la carence en fer, les bactéries vont utiliser diverses stratégies pour récupérer le fer des molécules chélatrices. La principale stratégie est l'utilisation de l'hème (voir Chapitre 3).

De nombreux pathogènes vont également pouvoir utiliser le fer lié à la transferrine et à la lactoferrine comme source de fer. Par exemple, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, possèdent des récepteurs capables de lier la transferrine et la lactoferrine et vont pouvoir récupérer directement le fer de ces molécules. D'autres bactéries vont produire des sidérophores qui vont entrer en compétition avec les protéines de l'hôte pour la séquestration du fer. Dans le cas de *P. aeruginosa*, la PVD a une affinité bien supérieure à celle de la lactoferrines et la transferrine ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$  pour la PVD contre  $10^{20} \text{ M}^{-1}$  pour la transferrine) et peut donc prendre le fer à ces protéines (Aisen *et al.*, 1978; Albrecht-Gary *et al.*, 1994). Cette compétition pour le fer sera favorisée par la production en parallèle d'une protéase (LasB) responsable de la dégradation de la transferrine (Wolz *et al.*, 1994). Enfin, l'acquisition du fer de l'hôte passe également par l'utilisation de xénosidérophores, du citrate ou des monocatéchols (voir les sections correspondantes dans le chapitre 4).

## 4.3 Molécules anti-sidérophores

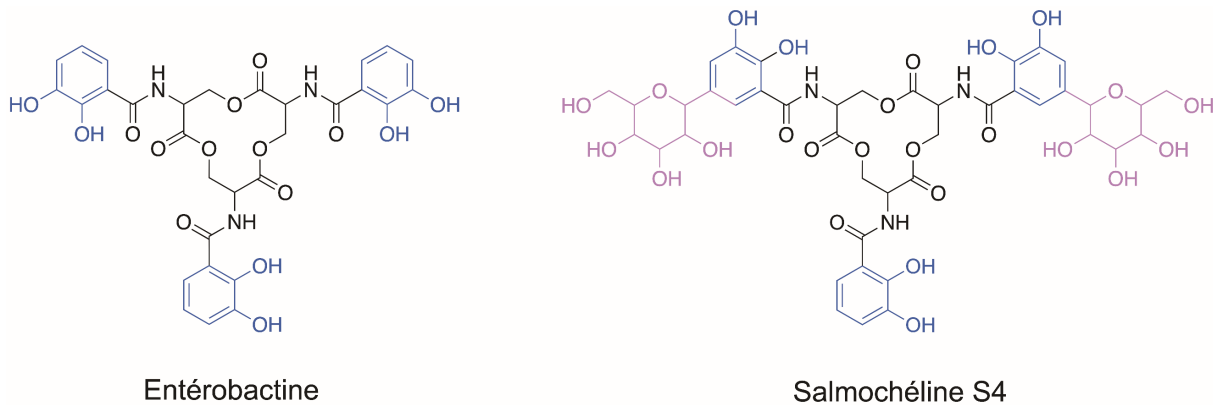
En réponse à la production de sidérophores par les bactéries, les cellules épithéliales vont sécréter des glycoprotéines appelées lipocalines, qui sont stockées dans les neutrophiles. Les lipocalines sont des agents bactériostatiques qui vont séquestrer les complexes ferri-sidérophores, empêchant leur utilisation par la bactérie (Flo *et al.*, 2004; Fluckinger *et al.*, 2004). Deux types de lipocaline sont produites : la lipocaline 1 produite dans les larmes et les sécrétions respiratoires, et la lipocaline 2 appelée sidéocaline ou NGAL (pour Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) que l'on retrouve en abondance dans le sérum. Cette dernière sera capable de reconnaître et de lier les sidérophores complexés au fer comme l'entérobactine (Figure 51) (Flo *et al.*, 2004). De plus, la lipocaline 2 possède une meilleure affinité pour les sidérophores sous forme ferrique que sous forme apo. En ce qui concerne la lipocaline 1, sa spécificité de liaison aux sidérophores est plus faible que la lipocaline 2. Elle serait toutefois impliquée dans la neutralisation des sidérophores de type hydroxamate, produits principalement par des mycètes retrouvés dans le cas d'infections respiratoires (Fluckinger *et al.*, 2004).



**Figure 51 :** Structure de la sidérocaldine (lipocaline 2 ou NGAL, en dégradé orange) liée au complexe ferri-entérobactine (en vert) formé dans l'environnement bactérien (PDB 3BY0) (Abergel *et al.*, 2008).

Certains pathogènes ont développé des mécanismes de défense contre la production de lipocalines par l'hôte qui consiste en la production de sidérophores modifiés qui ne pourront plus être reconnus par l'hôte. Ces sidérophores peuvent être des dérivés de sidérophores possédant des groupements supplémentaires qui vont augmenter l'encombrement stérique et conduire à la diminution de l'affinité entre le complexe ferri-sidérophore et la lipocaline. C'est le cas de la salmochéline S4 qui est un sidérophore produit par les espèces du genre *Salmonella*, mais également par certaines souches de *Klebsiella* et de souches uropathogènes d'*E. coli*. La salmochéline S4 est en effet un dérivé glycosylé de l'entérobactine dont l'encombrement stérique conduit à une absence de reconnaissance du sidérophore par la sidérocaldine (Figure 52) (Fischbach *et al.*, 2006). Certains sidérophores vont également posséder des groupements chélateurs qui ne seront pas reconnus par les sidérocaldines comme dans le cas de la yersiniabactine produite par des espèces du genre *Yersinia*, *Klebsiella* mais également par *P. syringae* (Bachman *et al.*, 2012). Enfin, chez *P. aeruginosa*, la sidérocaldine ne lie pas efficacement la PVD, ce sidérophore n'est donc pas neutralisé par l'hôte et sera toujours utilisable par la bactérie pour acquérir le fer de l'environnement (Peek *et al.*, 2012).

La diversité des mécanismes impliqués dans l'acquisition du fer par l'hôte et le pathogène illustre son rôle fondamental dans le maintien de la vie. Cette compétition permanente entre les deux protagonistes a façonné une dynamique d'adaptation réciproque, conduisant les bactéries à développer des stratégies sophistiquées pour déjouer les défenses de l'hôte.



**Figure 52 :** Structure chimique de l'entérobactine et de son dérivé glycosylé, la salmochéline S4, qui n'est plus reconnue par la sidérocaldine.

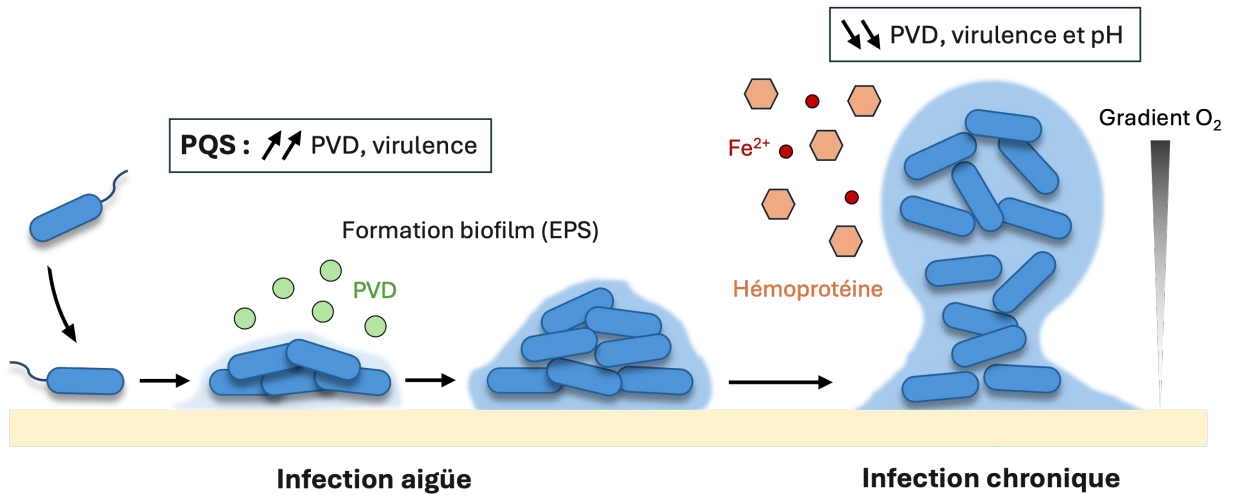
#### 4.4 Persistance des infections à *P. aeruginosa* chez l'Homme

Au cours d'une infection par *P. aeruginosa*, la disponibilité du fer est fortement restreinte en raison de l'immunité nutritionnelle mise en place par l'hôte, rendant ce métal un facteur limitant pour la croissance microbienne. Cette restriction conduit à une forte compétition entre l'hôte et le pathogène pour l'acquisition du fer.

La persistance des infections à *P. aeruginosa* chez l'Homme repose sur sa capacité à former des biofilms, lui conférant une meilleure tolérance aux stress environnementaux. La voie de la PVD joue un rôle central lors des premières étapes d'une infection à *P. aeruginosa*, en facilitant l'acquisition du fer nécessaire à sa croissance et à l'établissement du biofilm (Banin *et al.*, 2005; Díaz-Pérez *et al.*, 2022). De plus, la présence de PVD induit l'expression du facteur sigma PvdS, qui régule non seulement la transcription des gènes de la voie PVD, mais également de multiples facteurs de virulence, tels que l'exotoxine A (ToxA), la protéase PrpL, la pyocyanine et l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) (Figure 53), contribuant à la progression de l'infection.

Cependant, la persistance chronique de l'infection s'accompagne d'une modification de l'expression des voies d'acquisition du fer, en réponse aux conditions environnementales et aux besoins métaboliques réduits. En effet, des travaux menés sur des souches cliniques de *P. aeruginosa* ont montré que sa persistance chez l'hôte s'accompagne d'une réduction de sa virulence mais aussi à l'émergence d'un phénotype appelé « mucoïde », plus tolérant aux variations environnementales (Luzar and Montie, 1985; Moreau-Marquis *et al.*, 2008). Dans ce contexte, la voie PVD est fréquemment réprimée, sans induction compensatoire de la voie PCH (Konings *et al.*, 2013; Nguyen

*et al.*, 2014). Cette répression peut s'expliquer par la croissance ralentie en biofilm où les besoins intracellulaires en fer sont réduits, mais aussi par l'utilisation préférentielle d'une autre source de fer par la bactérie. En effet, le microenvironnement du biofilm mature s'accompagne d'une diminution du pH et d'une faible disponibilité de l'O<sub>2</sub>, à l'origine d'un gradient hypoxique et favorisant la formation d'ions ferreux, plus facilement assimilables (Figure 53) (Worlitzsch *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 2013).



**Figure 53 :** Schéma représentatif de l'évolution de l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* en réponse aux modifications environnementales. La voie PVD sera favorisée dans les premières étapes de formation du biofilm, puis sera remplacée par l'utilisation des voies de l'hème et du fer ferreux en réponse aux modifications environnementales liées à une infection prolongée chez l'hôte (diminution du pH, de l'oxygène).

Par ailleurs, l'hème et les hémoprotéines, prédominantes en contexte infectieux, constituent une source majeure de fer suffisante pour maintenir les besoins en fer de la bactérie (Hoang *et al.*, 2023). *P. aeruginosa* privilégie donc l'import de l'hème et du fer ferreux au détriment de la synthèse de ses propres sidérophores (Figure 53) (Moreau-Marquis *et al.*, 2008; Konings *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2014). La persistance d'une infection à *P. aeruginosa* conduit également à l'accumulation progressive de mutations adaptatives, dont la spécialisation dans l'exploitation de sources de fer alternatives en réponse à son environnement (Jenul *et al.*, 2023).



# Chapitre VI : Problématique du projet de thèse





Ces dernières années, les voies d'import du fer des sidérophores endogènes (PVD et PCH) ainsi que celles de l'entérobactine, du ferrichrome, de la nocardamine et de l'hème, ont été largement caractérisées d'un point de vue mécanistique chez *P. aeruginosa* (Schalk and Perraud, 2022). En revanche, peu de choses sont connues sur les mécanismes d'acquisition du fer *via* les autres xénosidérophores chez cette bactérie. Or, les sidérophores représentent une diversité structurale avec plus de 500 molécules de structures chimiques distinctes identifiées à ce jour, soulignant la richesse et la complexité de ces composés dans le monde vivant (Hider and kong, 2011). Ainsi, les sidérophores étudiés jusqu'à présent chez *P. aeruginosa* ne reflètent-ils qu'une fraction limitée de la diversité de xénosidérophores que *P. aeruginosa* peut rencontrer dans son environnement.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai cherché à identifier, parmi les xénosidérophores commercialement disponibles, ceux pouvant être utilisés par *P. aeruginosa* en condition de culture planctonique, et les TBDTs impliqués dans leur import. J'ai également exploré dans quelle mesure une voie d'acquisition du fer décrite pour un xénosidérophore particulier peut être utilisée pour l'import d'autres sidérophores présentant une structure chimique apparentée. J'ai réalisé le même type d'étude pour des chélateurs synthétiques analogues de la NOCA pouvant avoir des applications en imagerie médicale. L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact des différences structurales des xénosidérophores sur leur reconnaissance, leur import et leur utilisation par la bactérie.

En parallèle, je me suis également intéressée aux produits de dégradation du sidérophore PCH. Ce dernier présente en effet une faible stabilité chimique et se dégrade en acide aéruginoïque (AA) et acide dihydroaéruginoïque (DHA). Il a récemment été démontré que ces dérivés conservent une capacité à chélater le fer et à stimuler la croissance de *P. aeruginosa* lorsqu'ils sont présents dans le milieu de culture de la bactérie, suggérant un rôle potentiel en tant que sidérophores (Kaplan *et al.*, 2021). Dans ce contexte, j'ai cherché à identifier le ou les TBDTs impliqué(s) dans l'import du fer par ces composés et dans quelles conditions ces composés sont utilisés par *P. aeruginosa* pour accéder au fer.

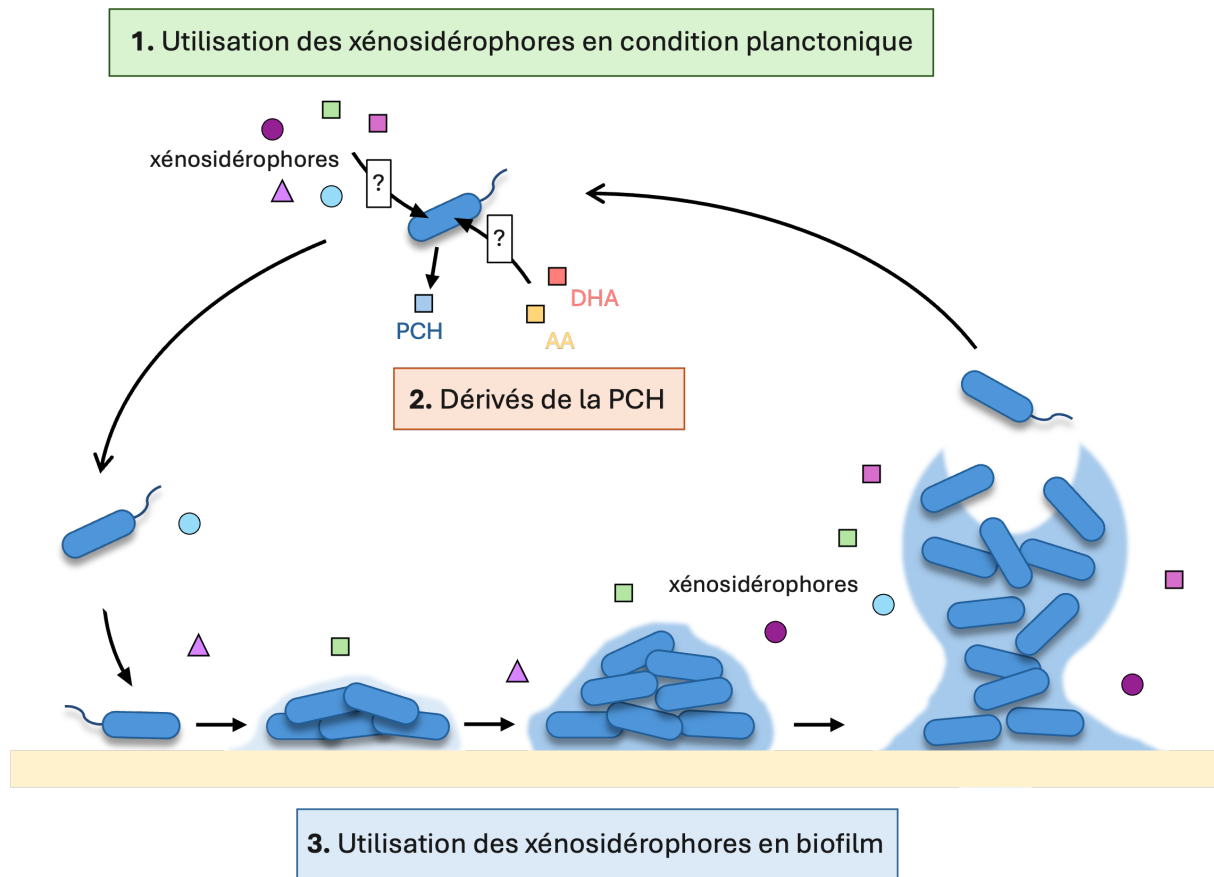


Figure 54 : Schéma général des différents axes de recherche étudiés au cours de ma thèse.

Enfin, je me suis intéressée à l'utilisation des xénosidérophores par *P. aeruginosa* en culture en biofilm. À ce jour, aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant l'exploitation des xénosidérophores permettant l'accès au fer par *P. aeruginosa* lorsqu'elle est cultivée en biofilm, les études sur *P. aeruginosa* étant principalement réalisées en condition planctonique. Les connaissances actuelles sur l'utilisation des sidérophores en biofilm se limitent aux voies endogènes, en particulier celle de la PVD, dont le rôle dans les différentes étapes de formation du biofilm a été mis en évidence dans les années 2000 (Banin *et al.*, 2005).

## PARTIE II : RÉSULTATS



Chapitre I : Utilisation des  
xénosidérophores et des chélateurs  
synthétiques par *P. aeruginosa*



# 1 Xénosidérophores de type hydroxamate

## 1.1 Article N°1: The role of FoxA, FiuA, and FpvB in iron acquisition via hydroxamate-type siderophores in *Pseudomonas aeruginosa*

Dans ce premier axe d'étude, nous avons caractérisé l'exploitation des xénosidérophores de la famille des hydroxamates par *P. aeruginosa* pour accéder au fer. Ces xénosidérophores sont majoritairement produits par des mycètes et par certaines espèces de Streptomyces, et représentent un intérêt particulier en raison de leur grande diversité structurale. En effet, les xénosidérophores de type hydroxamate peuvent être classés en 5 sous-famille selon leur structure chimique : les acides rhodotoruliques, les coprogènes, les fusarinines, les ferrioxamines et les ferrichromes. Étant donné leur diversité, il est probable que certaines bactéries aient développé des mécanismes spécifiques leur permettant d'exploiter ces xénosidérophores, dans le cadre d'une stratégie d'acquisition du fer inter-règne, ce qui semble être le cas de la bactérie ubiquiste *P. aeruginosa*.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à la capacité de *P. aeruginosa* à importer le fer via ces xénosidérophores. Nous avons sélectionné, parmi les xénosidérophores commerciaux, plusieurs représentants de chacune des cinq sous-familles mentionnées, possédant des affinités variables pour l'ion  $Fe^{3+}$  (Tableau 3). Les xénosidérophores étudiés comprennent l'acide rhodotorulique (RHODO) pour les acides rhodotoruliques, le coprogène pour les coprogènes, le triacétylfusarinine C (TAFC) et le fusigène pour les fusarinines, la desferrioxamine G (DFOG) pour les ferrioxamines et la ferricrocine, la ferrichrysine (CHRY), la ferrirhodine et la ferrirubine pour les ferrichromes. Au moment où nous avons initié cette étude, les xénosidérophores ferrichrome, NOCA, DFOB et bisucabérine avaient été décrits comme capables d'importer le fer chez *P. aeruginosa*, avec l'identification de leurs TBDTs associés : FiuA et FpvB pour le ferrichrome, FoxA pour la NOCA et la bisucabérine et FoxA et FpvB pour la DFOB (Llamas *et al.*, 2006; Chan and Burrows, 2022; Chan *et al.*, 2023). Pour le coprogène, la ferrirubine, la ferricrocine et la ferrichrysine, il avait été démontré qu'ils pouvaient importer le fer dans les cellules de *P. aeruginosa*, mais les TBDTs impliqués n'avaient pas été identifiés (Jurkevitch, Y. Hadar, *et al.*, 1992).

Pour évaluer la capacité de *P. aeruginosa* à utiliser les neuf xénosidérophores d'intérêt pour accéder au fer, deux approches expérimentales complémentaires ont été mises en œuvre. La première repose sur la capacité des xénosidérophores à stimuler la croissance bactérienne en condition de carence en fer, la seconde repose sur l'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$  dans les cellules. Le test de croissance a été réalisé sur une souche déficiente dans la production des sidérophores endogènes ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ), cultivée dans un milieu carencé en fer complété par un excès en xénosidérophore testé. Dans ces conditions, tout le fer disponible est chélaté par le xénosidérophore, contraignant la bactérie à utiliser exclusivement le xénosidérophore pour accéder au fer. Cette approche a montré que tous les xénosidérophores testés stimulent la croissance bactérienne, suggérant leur utilisation effective par la bactérie. Ces résultats ont été confirmés par des expériences de suivi d'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$ , qui révèlent une augmentation de la quantité en  $^{55}\text{Fe}$  intracellulaire en présence de chacun des xénosidérophores, validant leur rôle dans le transport du fer chez *P. aeruginosa*. Ainsi, *P. aeruginosa* peut utiliser la RHODO, le coprogène, le TAFC, le fusigène, la DFOG, la ferricrocine, la ferrichrysine, la ferrirhodine et la ferrirubine comme xénosidérophores.

Dans un deuxième temps, les tests de croissance bactérienne ont été utilisés pour identifier les TBDTs impliqués dans le transport du fer par les xénosidérophores testés. Pour ce faire, nous avons utilisé une souche de *P. aeruginosa* incapable de produire ses propres sidérophores et délétée pour un ou plusieurs gènes codant des TBDTs. Une diminution de la croissance bactérienne dans ces conditions indique alors l'implication du transporteur délété dans l'import des complexes ferri-xénosidérophores à travers la membrane externe. Ces expériences ont permis de démontrer que FpvB est le TBDT du coprogène, du TAFC, du fusigène, de la ferrirhodine et de la ferrirubine ; FpvB et FoxA sont les TBDTs du DFOG ; FpvB et FiuA sont les TBDTs de la ferricrocine et la ferrichrysine ; et RHODO est transporté par FiuA, FpvB et un autre TBDT non identifié. Ces résultats révèlent une sélectivité différente des TBDTs vis-à-vis des xénosidérophores de type hydroxamate : FpvB est impliqué dans l'import de tous les xénosidérophores testés, FiuA reconnaît préférentiellement les ferrichromes et FoxA les ferrioxamines.

Enfin, des approches complémentaires de protéomique différentielle et de RT-qPCR ont révélé que la présence de RHODO, ferricrocine et ferrichrysine induit l'expression de *fiuA*, tandis que la DFOG induit celle de *foxA*. En revanche, l'expression de *fpvB* ne semble pas être modulée par la



**présence des xénosidérophores testés.** Ces résultats suggèrent que *P. aeruginosa* répond à la présence des xénosidérophores dans son environnement en induisant l'expression de la voie la plus adaptée en fonction des conditions environnementales.



# OPEN The role of FoxA, FiuA, and FpvB in iron acquisition via hydroxamate-type siderophores in *Pseudomonas aeruginosa*

Virginie Will<sup>1,2</sup>, Chloé Frey<sup>1,2</sup>, Vincent Normant<sup>1,2</sup>, Lauriane Kuhn<sup>3</sup>, Johana Chicher<sup>3</sup>, Florian Volck<sup>1,2</sup> & Isabelle J. Schalk<sup>1,2</sup>✉

Siderophores are specialized molecules produced by bacteria and fungi to scavenge iron, a crucial nutrient for growth and metabolism. Catecholate-type siderophores are mainly produced by bacteria, while hydroxamates are mostly from fungi. This study investigates the capacity of nine hydroxamate-type siderophores from fungi and *Streptomyces* to facilitate iron acquisition by the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Growth assays under iron limitation and <sup>55</sup>Fe incorporation tests showed that all nine siderophores promoted bacterial growth and iron transport. The study also aimed to identify the TonB-dependent transporters (TBDTs) involved in iron import by these siderophores. Using mutant strains lacking specific TBDT genes, it was found that iron is imported into *P. aeruginosa* cells by FpvB for coprogen, triacetylfusarinine, fusigen, ferrirhodin, and ferrirubin. Iron complexed by desferrioxamine G is transported by FpvB and FoxA, ferricrocin-Fe and ferrichrycin-Fe by FpvB and FiuA, and rhodotoluric acid-Fe by FpvB, FiuA, and another unidentified TBDT. These findings highlight the effectiveness of hydroxamate-type siderophores in iron transport into *P. aeruginosa* and provide insights into the complex molecular mechanisms involved, which are important for understanding microbial interactions and ecological balance.

**Keywords** Siderophore, Iron homeostasis, *Pseudomonas aeruginosa*, TonB-dependent transporters, Hydroxamate siderophores, FpvB

Siderophores are specialized small molecules produced by bacteria and fungi, to facilitate the acquisition of iron, an essential nutrient<sup>1</sup>. Indeed, iron plays a key role in biology as a cofactor for numerous enzymes and proteins involved in critical cellular processes, including oxygen transport, DNA synthesis, and energy metabolism<sup>2</sup>. As iron is often present in limited concentrations because sequestered by host organisms in the context of infections or immobilized in insoluble forms in the environment at neutral pH and in aerobic conditions, the ability to produce and utilize siderophores is a key adaptation for microorganisms. This capability influences their competitiveness for iron resources and, consequently, their survival and growth in different environments<sup>3,4</sup>.

Import of iron into Gram negative bacteria by siderophores involves several molecular steps. The stable ferri-siderophores complexes formed in the bacterial environment are imported from the environment into the periplasm by specific outer membrane transporters called TonB-dependent transporters (TBDT)<sup>5</sup>. It is an active transport depending on the inner membrane TonB molecular machinery, composed of the proteins TonB, ExbB, and ExbD<sup>6–8</sup>. This TonB complex couples the proton motive force of the cytoplasmic membrane to the TBDTs located in the outer membrane, and that way energizes the transport process<sup>6–8</sup>. TonB interacts with TBDTs that bind iron-siderophore complexes, initiating a series of conformational changes in the TBDT allowing the release of the bound ferri-siderophore complex into the periplasm. Once inside the periplasm, two scenarios are possible. Either the ferric iron is released from the siderophore in the bacterial periplasm or the ferri-siderophore complex is transported further into the cytoplasm via specific inner membrane transporters<sup>9</sup>.

In iron chelation by siderophores, iron is typically surrounded by six coordinating oxygens belonging mostly to hydroxamate, catecholate, or carboxylate groups present in the siderophore structure<sup>1,10</sup>. Consequently,

<sup>1</sup>CNRS, UMR7242, UMR7242, ESBS, University of Strasbourg, Bld Sébastien Brant, 67412 Illkirch, Strasbourg, France. <sup>2</sup>UMR7242, ESBS, University of Strasbourg, Bld Sébastien Brant, 67412 Illkirch, Strasbourg, France. <sup>3</sup>Institut de Biologie Moléculaire Et Cellulaire, CNRS, UAR1589, Plateforme Proteomique Strasbourg - Esplanade, 2 Allée Konrad Roentgen, 67084 Strasbourg Cedex, France. ✉email: isabelle.schalk@unistra.fr

siderophores can be broadly classified into four families based on their functional groups chelating iron<sup>1,10</sup>. One major family is composed of siderophores having only hydroxamic acid functional groups for ferric iron chelation. Notable examples include ferrichrome and ferrichrysin<sup>11,12</sup>. Another prominent family consists of catecholate siderophores, featuring catechol or its derivatives as the iron-binding moiety. Enterobactin, produced by enteric bacteria, is the archetype siderophore of this family<sup>13</sup>. Carboxylate siderophores, such as citrate and staphyloferrin, represent another group that utilizes carboxylic acid groups for iron coordination<sup>14–16</sup>. In addition, there are mixed-function siderophores that incorporate multiple different iron-binding moieties within the same molecule, like pyoverdine produced by *Pseudomonas aeruginosa*<sup>17</sup>, which is composed of a catechol group and two hydroxamate groups for iron chelation, or aerobactin, schizokinen and arthrobactin, which are mixed  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate type siderophores<sup>18–20</sup>. In their general chemical structures, siderophores exhibit remarkable diversity across microbial species, reflecting adaptation to specific ecological niches and iron availability in their respective environments.

Tris-hydroxamate siderophores are produced mostly by fungi<sup>21–23</sup>. Interestingly, bacteria have evolved the ability to exploit these fungal tris-hydroxamate siderophores for their own iron acquisition strategies. This interkingdom iron-scavenging system underscores the complexity and adaptability of microbial communities, showcasing how organisms collaborate to overcome nutritional challenges in their ecosystems.

In the present work, we have investigated the ability of the opportunist pathogen *P. aeruginosa* to use hydroxamate siderophores produced by Fungi and Streptomyces to access iron. It is well known that *P. aeruginosa* produces two siderophores pyoverdine and pyochelin and is able in addition to use many siderophores produced by other microorganisms (xenosiderophores)<sup>24</sup>. The possibility to use diverse xenosiderophores is due to the presence in the genome of *P. aeruginosa* of diverse genes encoding TBDTs<sup>25,26</sup>. Currently, the only hydroxamate-type xenosiderophores known to facilitate iron import into *P. aeruginosa* cells, with their corresponding TBDT identified, are ferrichrome, nocardamine and desferrioxamine B, bisucaberin and the  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate mixed siderophores aerobactin, schizokinen and arthrobactin<sup>27–31</sup>. The TBDTs involved are FiuA and FpvB for ferrichrome, FoxA for nocardamine and bisucaberin, FoxA and FpvB for DFOB<sup>29</sup>, and ChtA for aerobactin, schizokinen and arthrobactin<sup>27–31</sup>. Additionally, *P. aeruginosa* can utilize coprogen, ferrirubin, ferricrocin, and ferrichrysin to access iron, though the specific TBDTs involved have not yet been identified<sup>32</sup>.

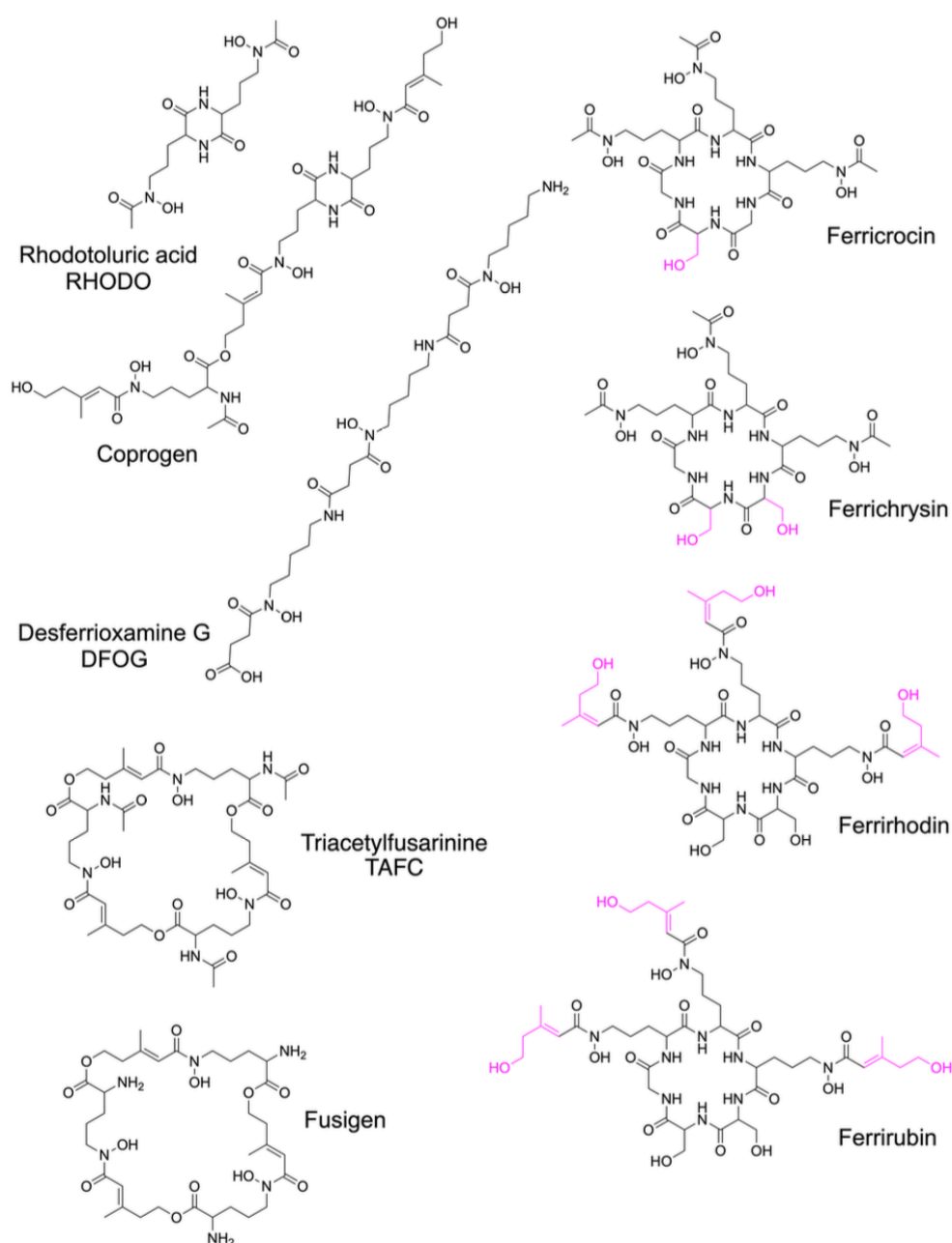
In the present study we demonstrated that nine hydroxamate-type siderophores effectively stimulated *P. aeruginosa* growth and transported iron into *P. aeruginosa* cells, with varying efficiencies and tried to identify the TBDTs involved. The results also indicated that four TBDTs, FpvB, FiuA, FoxA and an additional unidentified TBDT, are involved in facilitating iron import by these different siderophores, but with different transport specificities. Proteomic and RT-qPCR approaches showed that some of these siderophores, when present in the environment of *P. aeruginosa* are able to induce the transcription and expression of *fiuA* and *foxA*.

## Results

### Description of the xenosiderophores used in the present study

Catecholate-type siderophores are exclusively produced by bacteria, while hydroxamates are predominantly produced by fungi but are also found in several bacterial species, including actinomycetes<sup>23,33,34</sup>. The family of hydroxamate-type siderophores can be classified into 5 subfamilies based on their chemical structure, including rhodotorulic acid, coprogen-, fusarinine-, ferrioxamine-, and ferrichrome-type siderophores<sup>35</sup>. Among the commercially available siderophores (Biophore Research Product), we selected several representatives from each of the 5 subfamilies for our study. Their chemical structures are presented in Fig. 1.

Rhodotorulic acid (RHODO) possesses a unique chemical structure featuring a pyridine ring and a long acyl chain. Its iron-chelating ability is attributed to the two hydroxamate groups within the molecule. RHODO is produced by species of yeasts of the genus *Rhodotorula*<sup>36,37</sup>. Coprogens are a subfamily of siderophores produced by fungi, and different species or strains of fungi may produce coprogens with distinct structures. The general features comprise a pyridine ring in a trimeric linear tris-hydroxamate backbone, with specific modifications or substitutions leading to variations in the chemical structure among different coprogens. Here, we tested the coprogen produced by *Neurospora crassa*<sup>38</sup>. Triacetylfusarinine C (TAFC) and fusigen belong to the fusarin subfamily and share the same trimeric cyclic ester backbone with three endo-hydroxamate groups for iron coordination but differ in specific modifications or substitutions in the molecule<sup>39</sup>. TAFC is produced by species of the genus *Aspergillus*<sup>40</sup>, while fusigen is produced by *Ascomycota*, such as species of the genus *Fusarium*, and by *Basidiomycota*, such as species of the genus *Laccaria*<sup>41–43</sup>. Desferrioxamine G (DFOG) is a linear tris-hydroxamate siderophore with the same tris-hydroxamate backbone as the well-known desferrioxamine E, also called nocardamine, except that in the case of nocardamine, it is a cyclic tris-hydroxamate siderophore. DFOG is produced by *Hafnia alvei*<sup>44</sup>. We have also tested ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin, and ferrirubin, having a chemical structure composed of a peptide macrocycle as the one found in the ferrichrome and with three exo-hydroxamate groups for iron chelation. Ferrichrome is a cyclic hexapeptide composed of three glycines and three acylated  $\delta$ -N-hydroxyornithyl residues, with the hydroxamate groups of the ornithines chelating iron. In contrast, ferricrocin is a cyclic hexapeptide composed of two glycines, one serine, and three modified ornithine residues with hydroxamate groups. Ferrichrysin, ferrirhodin, and ferrirubin all share a cyclic hexapeptide composed of one glycine, two serines, and three modified ornithine residues. The differences lie in the modification of the acetylated ornithines, as shown in Fig. 1. Ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin, and ferrirubin are produced by species of the genus *Aspergillus* such as *A. fumigatus* or *A. ochraceus*<sup>45–47</sup>. Ferrirhodin is also produced by plant pathogens of the phylum *Ascomycota* such as *Fusarium sacchari* or *Botrytis cinerea*<sup>48,49</sup>. The affinities for iron of these nine different siderophores are summarized in Table S1.



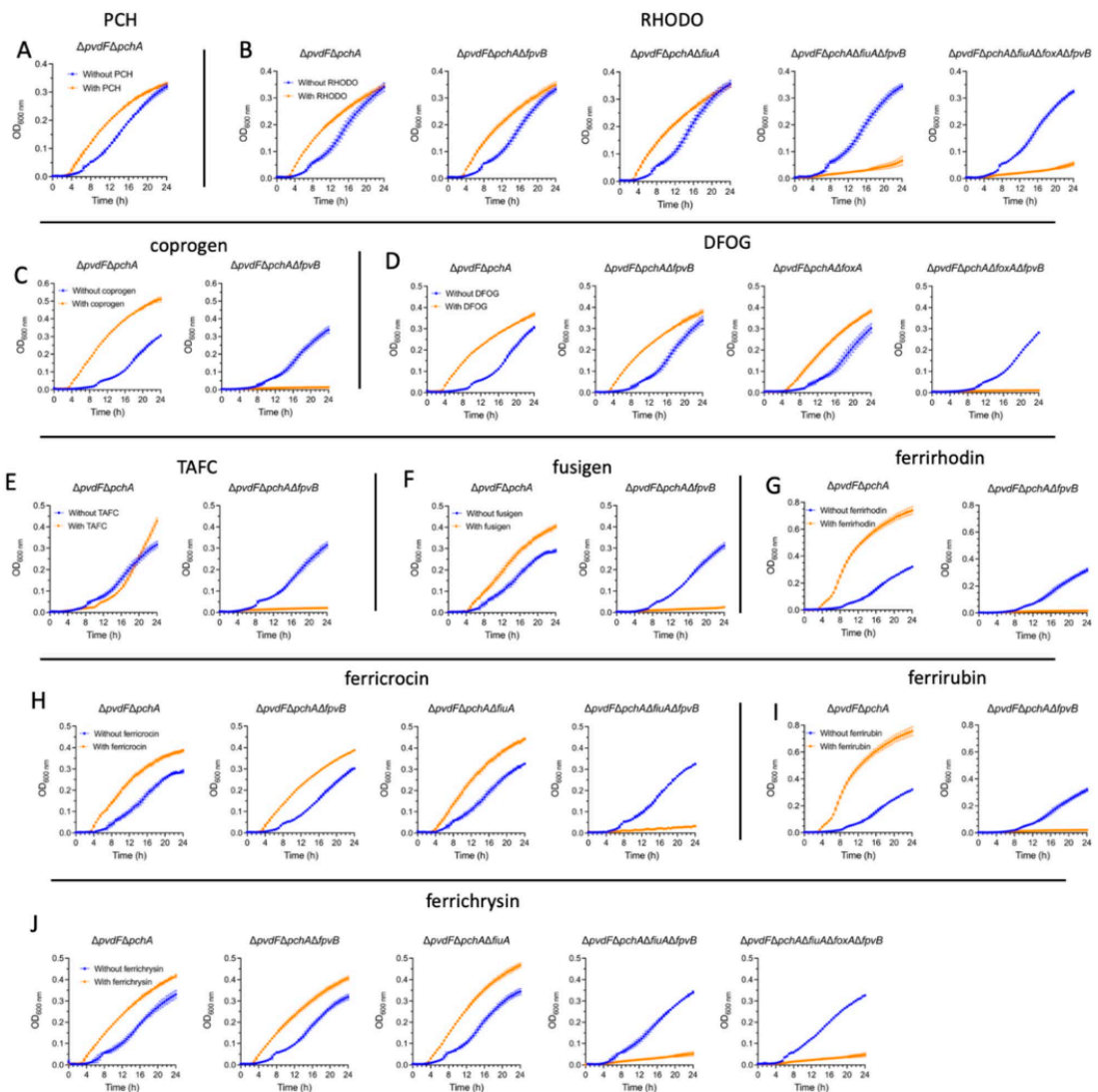
**Figure 1.** Chemical structures of the hydroxamate siderophores tested in the present study. For ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin and ferrirubin, the differences in their chemical structures are highlighted in pink. Ferrirhodin and ferrirubin have the same chemical structures except that ferrirhodin has three cysteine-anhydromevalonyl groups and ferrirubin three trans-anhydromevalonyl groups.

#### All the xenosiderophores tested were able to supply *P. aeruginosa* with iron

We initially assessed the ability of the siderophores presented in Fig. 1 to function as xenosiderophores for iron acquisition by *P. aeruginosa*. Two distinct approaches were employed. The first is based on the capacity to promote the growth of *P. aeruginosa* in an iron-deficient medium, while the second involves the incorporation of  $^{55}\text{Fe}$ . Both assays have been comprehensively described in previously published studies and have proven effective<sup>31,50–52</sup>. For the growth assay, we employed a strain of *P. aeruginosa* ( $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}$ ) incapable of producing



its own siderophores, pyoverdine, and pyochelin, due to the deletion of two genes encoding enzymes involved in the biosynthesis of these siderophores<sup>53</sup>. This mutant is cultivated in CAA medium, which is iron-deficient (approximately 20 nM iron concentration<sup>54</sup>), and in the presence of 10  $\mu$ M of the tested siderophore. The excess siderophore chelates all the iron present in the CAA medium. If the bacteria are able to use the siderophore, growth is observed, as with pyochelin (PCH), one of the two siderophores produced by *P. aeruginosa* (Fig. 2A). If the bacteria cannot utilize the siderophore for iron acquisition, complete growth inhibition is observed. Bacillobactin, for instance, serves as an illustration as it completely inhibits the growth of *P. aeruginosa* under the conditions of the test culture<sup>52</sup>. For the nine xenosiderophores we tested, we observed stimulation of *P. aeruginosa* growth, indicating that these molecules can be used as siderophores by this pathogen (Fig. 2 data with strain  $\Delta$ pvdF $\Delta$ pchA).



**Figure 2.** Growth of  $\Delta$ pvdF $\Delta$ pchA mutants in the presence of RHODO, coprogen, DFOG, T AFC, fusigen, ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin, or ferrirubin.  $\Delta$ pvdF $\Delta$ pchA and its corresponding *fvpvB*, *fviuA* and *foxA* deletion mutants were grown in CAA medium in the absence (growth kinetics in blue) or presence (kinetics in orange) of 10  $\mu$ M pyochelin (PCH), RHODO, coprogen, DFOG, T AFC, fusigen, Ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin, and ferrirubin. Growth was followed by monitoring the optical density at 600 nm. Error bars were calculated from three independent biological replicates. Since a growth stimulation was observed for some siderophores tested, the OD scales are not the same in all the strains tested.

The results were further validated by the  $^{55}\text{Fe}$  incorporation assay. In this test, siderophore- $^{55}\text{Fe}$  complexes were formed with each of the different siderophores from Fig. 1 by mixing the siderophores with  $^{55}\text{Fe}$  as described in the Experimental Procedures. These complexes were incubated with  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells, and radioactivity incorporated into the bacteria was measured over time. All nine tested molecules demonstrated the ability to transport  $^{55}\text{Fe}$  into *P. aeruginosa* cells, albeit with variations in efficiency (Fig. 3A). RHODO imported around  $210 \text{ pmol.mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}^{-1}$  of  $^{55}\text{Fe}$  when incubated during 3 h with  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells, ferricrocin  $360 \text{ pmol.mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}^{-1}$ , ferrichrysin,  $250 \text{ pmol.mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}^{-1}$ , and TAFC  $50 \text{ pmol.mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}^{-1}$ . All other xenosiderophores tested transported between 95 and  $150 \text{ pmol.mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}^{-1}$ . These uptakes of  $^{55}\text{Fe}$  are due to an active transport and not to diffusion via porins, as the presence of carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP), an inhibitor of bacterial proton motive force, inhibits the transport.

In conclusion, both approaches demonstrated that the nine hydroxamate-type siderophores can effectively transport iron into *P. aeruginosa* cells.

### FpvB, FiuA, and FoxB are the TonB-dependent transporters (TBDTs) involved in the import of iron by the 9 hydroxamate siderophores tested

The growth assay under iron-deficient conditions also serves to identify the TBDTs responsible for iron import by the tested siderophores. To achieve this, strains of *P. aeruginosa* that are incapable of producing pyoverdine and pyochelin and are mutated for one or more gene(s) encoding a (or several) TBDT(s) must be employed. If the deletion of a gene encoding a TBDT affects bacterial growth in the presence of a specific siderophore, it implies that the tested siderophore can no longer import iron into the bacteria because it utilizes the mutated TBDT. If growth inhibition is total, it indicates that this mutated TBDT is the sole participant in the iron import mediated by the tested siderophore. If partial inhibition is observed, one or more additional TBDTs are involved. In addition to this growth test, we also used the  $^{55}\text{Fe}$  incorporation test with strains mutated for one or more genes encoding one or several TBDTs.

For RHODO, the results obtained are intricate. Deletion of either *fpvB* or *fiuA* alone has no effect on bacterial growth (Fig. 2B). In contrast, the double mutation *fpvB/fiuA* almost completely inhibits growth, but a very low residual growth seems to persist. The growth inhibition observed with the double *fpvB/fiuA* mutation indicates that both TBDTs encoded by these genes are involved in iron import by RHODO. If one is absent, the other can compensate without affecting bacterial growth. *FoxA* deletion has no additional effect on growth inhibition. Concerning the import of  $^{55}\text{Fe}$ , double deletions of *fiuA* and *fpvB* do not completely inhibit  $^{55}\text{Fe}$  import (Fig. 3), suggesting that another unidentified TBDT is also involved. We have tested the deletion of some other genes encoding TBDTs (*chtA* and *PA0151*), but without success (Figure SM1). In conclusion, iron is transported into *P. aeruginosa* cells by FpvB, FiuA, and another unidentified TBDT. However, iron import by this third TBDT does not seem very effective in supporting bacterial growth, as the deletion of *fiuA* and *fpvB* nearly inhibits bacterial growth.

For coprogen, TAFC, fusigen, ferrirhodin and ferrirubin, complete growth inhibition is observed with the sole deletion of the *fpvB* gene, indicating that the ferric complexes of these five xenosiderophores enter *P. aeruginosa* cells through the TBDT FpvB (Fig. 2C,E–G,I). These results are confirmed by the  $^{55}\text{Fe}$  import test (Fig. 3). When *fpvB* is deleted, no incorporation of  $^{55}\text{Fe}$  is observed with any of these five xenosiderophores. FpvB is the only TBDT involved in iron import by coprogen, TAFC, fusigen, ferrirhodin and ferrirubin.

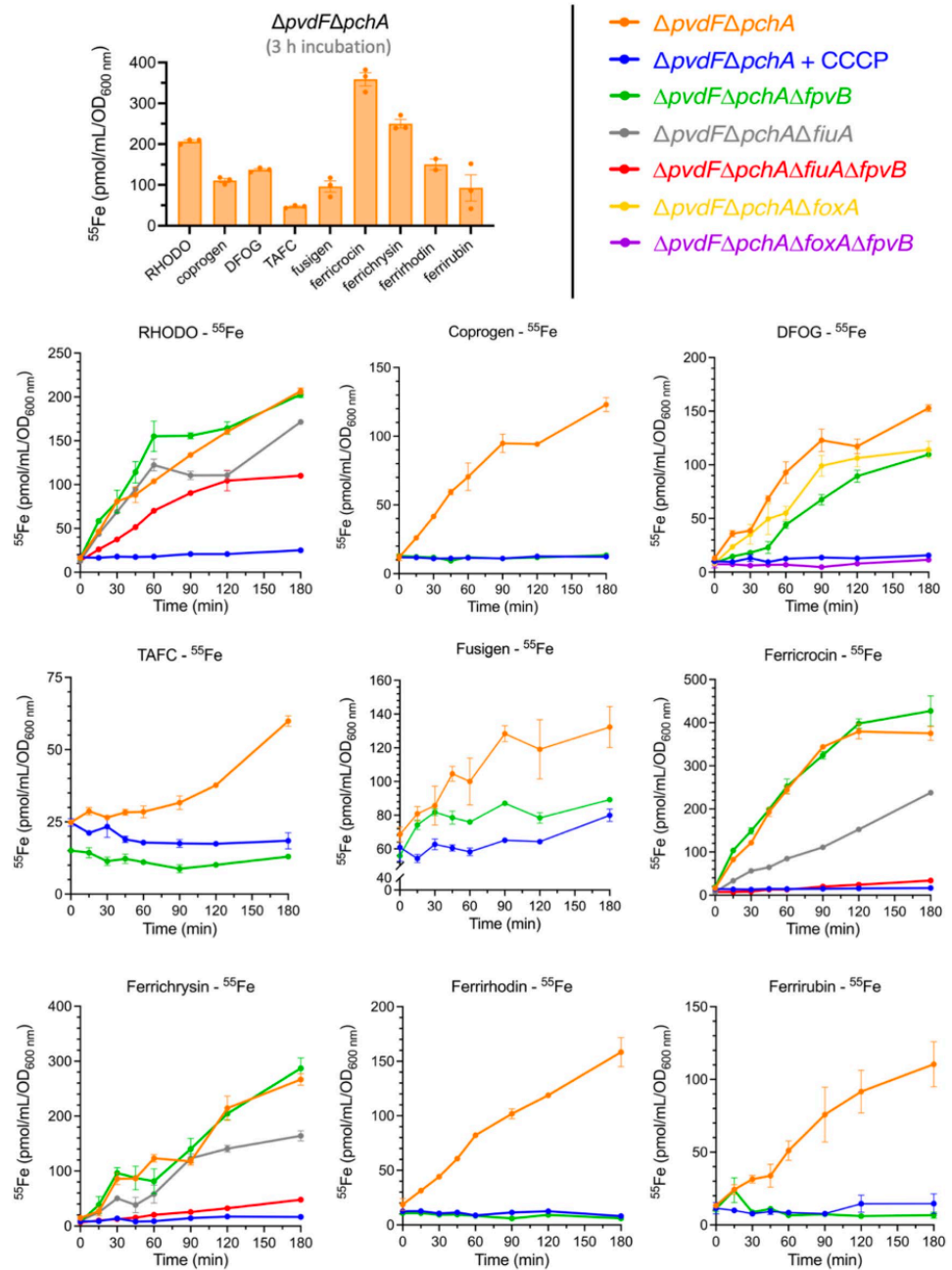
For DFOG, the single deletion of *fpvB* or *foxA* had no effect on the bacterial growth. A complete growth inhibition is observed only for the double mutant *foxA/fpvB*, indicating that both TBDTs are involved in the import of DFOG-Fe complexes, and if one is absent, the other can replace it (Fig. 2D). The  $^{55}\text{Fe}$  import tests is consistent with these results (Fig. 3). The deletion of both *foxA* and *fpvB* is required to completely inhibit bacterial growth.

For ferricrocin and ferrichrysin, complete growth inhibition is observed for the double mutant *fiuA* and *fpvB*, and not for the corresponding single mutants, indicating that both TBDTs are responsible for iron import by ferricrocin and ferrichrysin, and one can replace the other if absent (Fig. 2H,I). The  $^{55}\text{Fe}$  import tests are consistent with these results (Fig. 3), there is total inhibition with the double mutation *fiuA/fpvB*. But it is interesting to note that the simple deletion of *fpvB* does not affect the import of iron by these two siderophores, whereas the mutation of *fiuA* affects it by 40% after 3 h of incubation, indicating that iron import primarily occurs through FiuA and less through FpvB. Such a difference was not observed for iron import via DFOG through the TBDTs FoxA and FpvB.

Altogether, the data show that RHODO-Fe is imported into bacterial cells by FpvB, FiuA, and another unidentified TBDT. Coprogen-Fe, TAFC-Fe, fusigen-Fe, ferrirhodin-Fe, and ferrirubin-Fe are imported solely by FpvB. DFOG-Fe is imported by FpvB and FoxA. Ferricrocin-Fe and ferrichrysin-Fe are imported by FpvB and FiuA.

### RHODO, ferricrocin and ferrichrysin induce the transcription and expression of *fiuA* and DFOG of *foxA*

The transcriptional regulation of genes encoding TBDTs is primarily controlled by the Ferric uptake regulator (Fur) protein in most bacteria<sup>55–58</sup>. Fur is a global regulatory protein that responds to iron availability in the bacterial cells. When iron is abundant, Fur binds to iron and forms a complex that can attach to specific DNA sequences called Fur boxes, which are located in the promoter regions of genes encoding TBDTs. This binding represses the transcription of these genes, preventing the synthesis of TBDTs. Conversely, under low iron conditions, the Fur-iron complex dissociates, leading to derepression of TBDT genes transcription. This allows the bacteria to express TBDTs, facilitating the uptake of iron from the environment to meet cellular needs. In addition, it is well known that certain genes encoding TBDTs have their transcription regulated by the presence of their corresponding iron-loaded xenosiderophores in the environment of *P. aeruginosa*, in iron deficiency growth conditions<sup>28,31,50,52,59</sup>. These transcriptional regulations necessitating the presence of iron-loaded



**Figure 3.** <sup>55</sup>Fe uptake by *P. aeruginosa* strains mediated by RHODO, coprogen, DFOG, T AFC, fusigen, ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin, or ferrirubin. *P. aeruginosa* ΔpvdFΔpchA cells were grown in iron-restricted CAA medium in the presence of 10 μM RHODO, coprogen, DFOG, T AFC, fusigen, ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin, and ferrirubin to induce expression of the corresponding uptake pathway. Afterwards, bacteria were incubated with 500 nM RHODO-<sup>55</sup>Fe, coprogen-<sup>55</sup>Fe, T AFC-<sup>55</sup>Fe, fusigen-<sup>55</sup>Fe, DFOG-<sup>55</sup>Fe, ferricrocin-<sup>55</sup>Fe, ferrichrysin-<sup>55</sup>Fe, ferrirhodin-<sup>55</sup>Fe, and ferrirubin-<sup>55</sup>Fe. The amount of <sup>55</sup>Fe taken up by the bacteria was measured as a function of time. As a control, the experiment was repeated in the presence of the protonophore CCCP (200 μM). The experiment was also repeated with the corresponding fpvB, fiuA and foxA deletion mutants of ΔpvdFΔpchA. Error bars were calculated from three independent biological replicates. In the case of fusigen, a high level of radioactivity in the cell pellet was already observed at time zero due to the precipitation of either uncomplexed <sup>55</sup>Fe or fusigen-<sup>55</sup>Fe complexes.



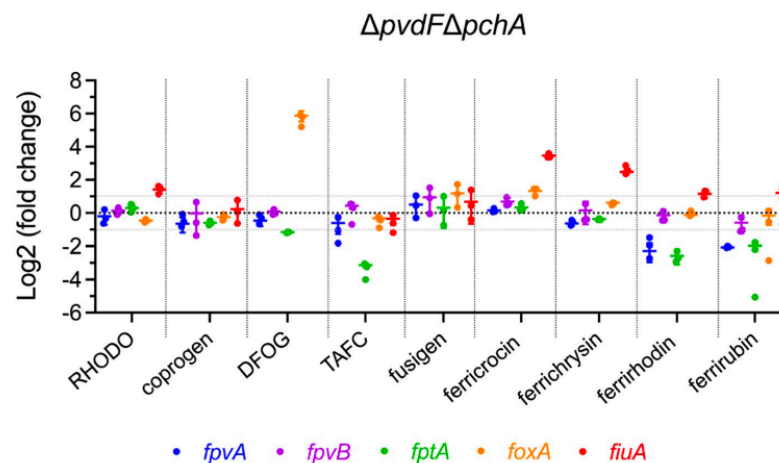
xenosiderophores involve sigma and anti-sigma factors, two-component systems, and transcriptional regulators of the AraC family<sup>60–66</sup>. The transcription of *fiuA* and *foxA* is regulated by Fur and by the sigma and anti-sigma factors FiuI/FiuR and FoxI/FoxR respectively<sup>63</sup>. For the *fpvB* gene, only regulation by Fur is present according to genome analysis<sup>67</sup>.

To verify if the transcription of *fiuA*, *foxA*, and *fpvB* could be regulated by certain siderophores tested in this study, a qRT-PCR study was conducted (Fig. 4). We examined the transcription of three genes *fiuA*, *foxA*, and *fpvB*, as well as *fptA* and *fpvA*, because often the induction of the transcription of a gene encoding TBDTs goes hand in hand with the repression of the transcription of *fptA*, the gene encoding for the TBDT involved in iron import by pyochelin, and more rarely, repression of *fpvA*, the gene encoding for iron import by pyoverdine<sup>28,31,50,52,59</sup>. This study was conducted on the strain not producing pyoverdine and pyochelin ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ), in the presence of 10  $\mu\text{M}$  of one of the tested xenosiderophores, and after 8 h of culture under iron restricted conditions (the preculture of  $\Delta pvdF\Delta pchA$  was already carried out under iron restricted conditions).

No significant induction of the transcription of the genes *fpvB*, *foxA*, and *fiuA* was observed in the presence of coprogen, TAFC, fusigen, ferrirhodin and ferrirubin (Fig. 4):  $\log_2$  fold change (FC) around 1. However, in the presence of 10  $\mu\text{M}$  DFOG, we observed a strong induction of *foxA* transcription ( $\log_2$  (FC) = 5,9). In the presence of 10  $\mu\text{M}$  ferricrocin, and ferrichrysin, an induction of *fiuA* transcription was observed ( $\log_2$  (FC) of 3,5 and 2,5 respectively) as well as in the presence of 10  $\mu\text{M}$  RHODO but in a lesser extent ( $\log_2$  (FC) = 1,4). A strong repression of *fptA* transcription was observed with TAFC, and a repression of both *fptA* and *fpvA* transcription was observed with ferrirhodin and ferrirubin. All the other xenosiderophores had no effect on the transcription of *fpvA* and *fptA*.

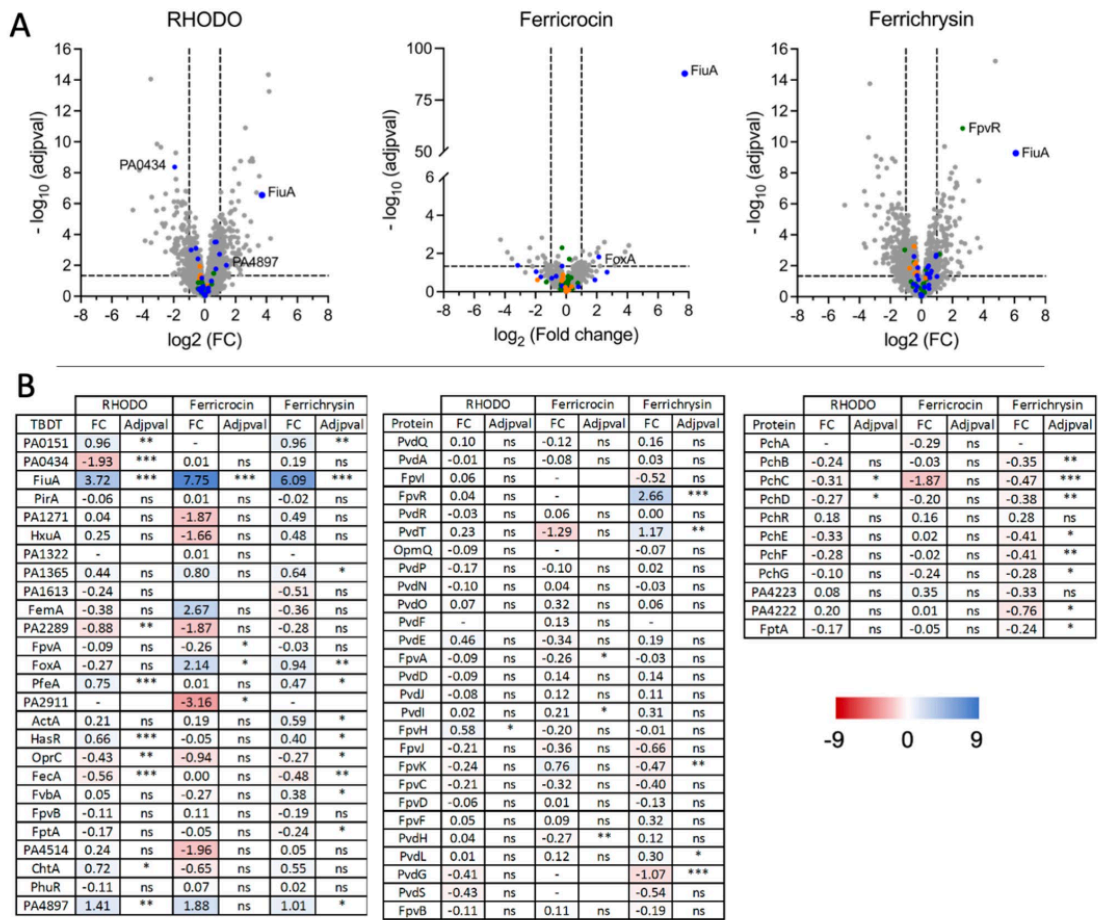
A differential proteomic approach was used to confirm the RT-qPCR data for ferricrocin and ferrichrysin, which induce the transcription of *fiuA* (Fig. 5). Additionally, this approach aimed to determine if, in the case of RHODO, we could identify another TBDT besides FoxA or FiuA whose expression is induced by the presence of this molecule. The proteomic approach could not be carried out with DFOG and the other xenosiderophores because we had no more of these molecules available. In the case of RHODO, aside from FiuA ( $\log_2$  fold change of 3.72), no other TBDT was identified with induced expression in the presence of this molecule. Moreover, the presence of RHODO had no effect on the expression levels of the various proteins in the pyoverdine and pyochelin pathways. Ferricrocin and ferrichrysin both induced only the expression of *fiuA*, with  $\log_2$  fold changes of 7.75 and 6.09 respectively, confirming the RT-qPCR data. Regarding the expression levels of the proteins in the pyochelin and pyoverdine iron uptake pathways, only an induction of FpvR expression was observed in the presence of ferrichrysin. No other effects were seen. The molecular mechanism by which this xenosiderophore modulates FpvR expression, an anti-sigma factor involved in regulating the transcription of various genes in the pyoverdine pathways, remains unclear.

In conclusion, RT-qPCR data showed an induction of *foxA* transcription in the presence of DFOG and of *fiuA* transcription in the presence of ferricrocin and ferrichrysin, which was confirmed by proteomic analysis. RHODO also seems to induce the transcription of *fiuA* according to proteomic data, but with lower efficiency than ferricrocin and ferrichrysin. This leads to the conclusion that all xenosiderophores utilizing the TBDT FiuA and FoxA are probably able to induce its transcription and expression with varying efficiencies. These regulations certainly involve the sigma and anti-sigma factors FiuI/FiuR and FoxI/FoxR for *fiuA* and *foxA* respectively.



**Figure 4.** Modulation of TBDT gene transcription by RHODO, coprogen, DFOG, TAFC, fusigen, ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin, or ferrirubin. *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells were grown for 8 h in the presence or absence of 10  $\mu\text{M}$  of one of the xenosiderophores. The transcription of *fpvA*, *fpvB*, *fptA*, *foxA* and *fiuA* was followed by qRT-PCR<sup>53</sup>. *fpvA* and *fpvB* encodes the ferri-pyoverdine TBDT, *fptA* the ferri-pyochelin TBDT, *foxA* the ferri-nocardamine TBDT and *fiuA* the ferri-ferrichrome TBDT<sup>24</sup>.



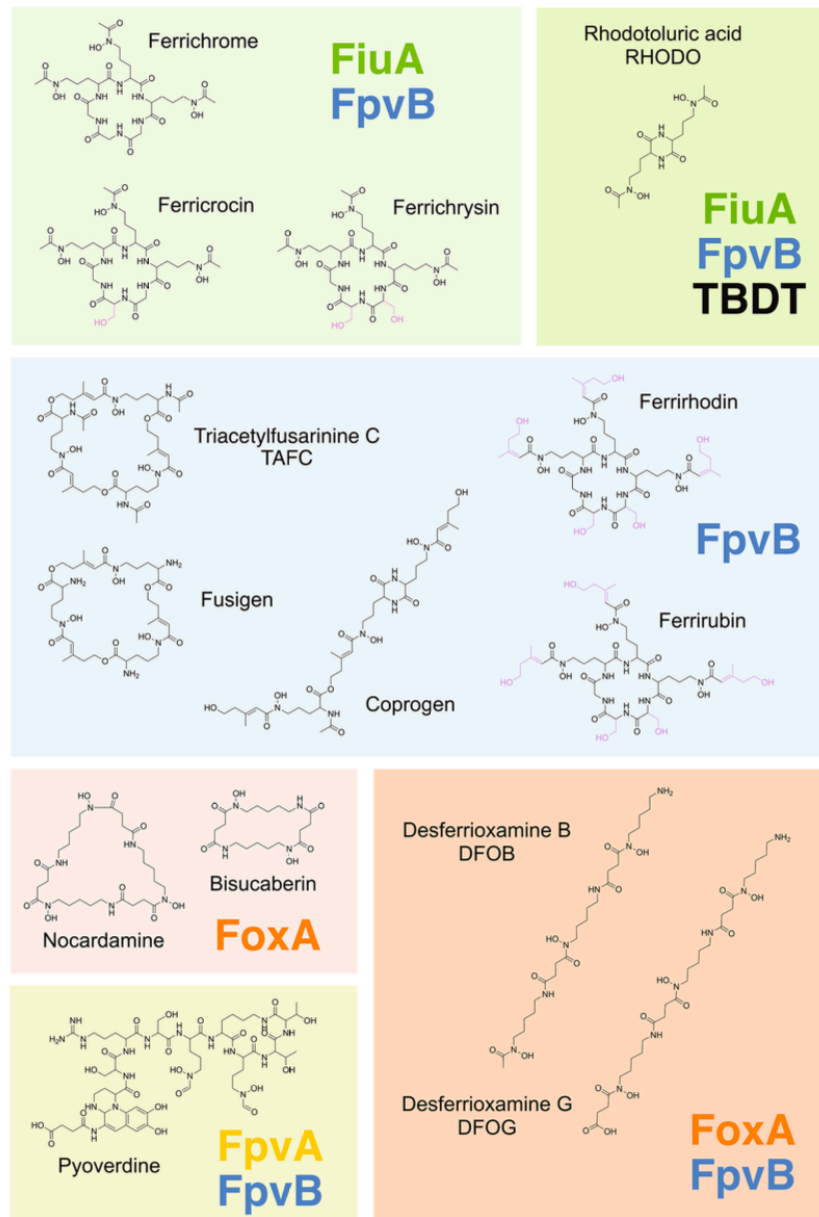


**Figure 5.** Analysis of changes in the expression of proteins involved in iron-uptake pathways in *P. aeruginosa* cells grown under iron-limited conditions in the presence of RHODO, ferricrocin or ferrichrysin. **A.** Proteomic analyses were performed on the pyoverdine- and pyochelin-deficient *P. aeruginosa* strains ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ) grown overnight in CAA supplemented, or not, with 10  $\mu\text{M}$  RHODO, ferricrocin or ferrichrysin. Average values measured in the presence of 10  $\mu\text{M}$  RHODO, ferricrocin or ferrichrysin are plotted against average values measured in the absence of any supplementation with xenosiderophores. Median values represent the median of the relative intensity of each protein, normalized against all proteins detected by shotgun analysis ( $n = 3$ ). The proteins of the pyochelin pathway are represented by orange dots, those of the pyoverdine pathway by green dots, and the TBDTs by blue dots. **B.** Heat maps of various TBDTs and proteins involved in the pyochelin and pyoverdine iron uptake pathways: the darker the shade of blue, the higher the expression of the protein; the darker the shade of red, the more the expression of the protein is repressed. NS, not significant.

### Discussion

According to the nature of the chemical groups that chelate iron, siderophores can be classified into four classes: hydroxamates, catechols, carboxylic acids, and mixed siderophores, which contain at least two chelating groups of different natures<sup>10,68</sup>. Regarding hydroxamate-type siderophores, this group can be further subdivided into five subtypes (rhodotorulic acid, coprogen, fusarinine, ferrioxamine, and ferrichrome type siderophores) based on their chemical structure, with the chelating functions being exclusively hydroxamates in all five subtypes<sup>35</sup>. In this study, we demonstrated that *P. aeruginosa* can utilize siderophores from each of these five subtypes to access iron.

The import of iron by these nine xenosiderophores into *P. aeruginosa* cells occurs via four different TBDTs: FiuA, FoxA, FpvB and another unidentified TBDT that we were unable to identify (Fig. 6). Coprogen, triacetyl-fusarinine C, fusigen, ferrirhodin, and ferrirubin siderophores import iron into *P. aeruginosa* cells exclusively via FpvB. Iron complexed by DFOG is imported as previously shown for desferrioxamine B-Fe (DFOB)<sup>29</sup> by two TBDTs, FpvB and FoxA. As previously shown for ferrichrome-Fe<sup>29</sup>, ferricrocin-Fe and ferrichrysin-Fe complexes, enter the bacteria through FpvB and FiuA. Finally, rhodotorulic acid-Fe complexes are imported by FpvB, FiuA, and another unidentified TBDT.



**Figure 6.** FiuA, FpvB, FoxA and FpvA transport selectivity. FiuA is the TBDT of the ferric forms of ferrichrome, ferricrocin, ferrichrysin and RHODO; FpvB of the ferric forms of ferrichrome, ferricrocin, ferrichrysin, RHODO, T AFC, fusigen, coprogen, ferrirhodin, ferrirubin, pyoverdine, DFOB and DFOG; FoxA of the ferric forms of nocardamine, bisucaberin, DFOB and DFOG; and at last FpvA of the ferric form of pyoverdine. In pink are highlighted the differences in the chemical structures of ferrichrome, ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin and ferrirubin.

These data also confirm that FpvB, FiuA, and FoxA have distinct selectivities for siderophore-Fe uptake. FpvB can import the ferric complexes of all nine hydroxamate-type xenosiderophores tested, indicating a broad uptake and certainly binding selectivity. Initially described as an alternative TBDT for iron uptake by the siderophore pyoverdine, with FpvA being the primary transporter, FpvB has more recently been identified as a TBDT

involved in the uptake of iron by ferrichrome and DFOB<sup>29,69</sup>. The same authors determined the affinity of FpvB for iron-chelated ferrichrome, DFOB, and pyoverdine, showing that FpvB has a higher affinity for iron-chelated ferrichrome and DFOB than for pyoverdine-Fe<sup>29</sup>. In the case of DFOB-Fe, they observed a two-site binding model, which was not seen for the other two siderophores<sup>29</sup>. Additionally, a structural model of FpvB generated by AlphaFold2, combined with docking studies and site-directed mutagenesis experiments conducted by the same group, suggests that all three ligands bind to a similar hydrophobic pocket in FpvB<sup>29</sup>. Since FpvB imports iron via all nine hydroxamate-type siderophores tested in the present study without exception, it is likely that this transporter is capable of recognizing and transporting many other hydroxamate-type siderophores found in nature.

Our data show that FiuA specifically recognizes and transports ferrichrome-type xenosiderophores: ferrichrome as already previously described<sup>27,29</sup>, ferrichrysin, and ferricrocin. The cyclic hexapeptide structure of these compounds appears crucial for recognition and uptake by FiuA, as this TBDT exclusively transports xenosiderophores with such a structure. A certain variability in the sequence of this hexacyclic structure is tolerated, as the three cyclic hexapeptide sequences Gly-Gly-Gly-Orn-Orn-Orn (ferrichrome), Gly-Gly-Ser-Orn-Orn-Orn (ferricrocin), and Gly-Ser-Ser-Orn-Orn-Orn (ferrichrysin) can all be recognized and transported by FiuA when complexed with iron. The three-dimensional X-ray structure of the cyclic iron(III)-containing hexapeptide ferrichrysin shows similarities with that of the related ferrichrome, which probably explains why both compounds can be recognized by FiuA<sup>12</sup>. In both structures, the iron(III) ions are coordinated by three hydroxamate groups in an octahedral cis- $\Delta$  arrangement<sup>12</sup>. However, if the three acylated  $\delta$ -N-hydroxyornithyl residues are modified or bulky, as seen in ferrirubin or ferrirhodin, it affects recognition by FiuA without impacting binding to FpvB. FiuA also recognizes ferric forms of RHODO, which likely have a distinct 3D structure compared to the ferric forms of ferrichrome, ferrichrysin, and ferricrocin, and may bind to FiuA differently.

FoxA transports iron chelated by DFOG, DFOB, and nocardamine (also known as DFOE), which are hydroxamate xenosiderophores of the desferrioxamine family, as well as bisucaberin<sup>28,30,30</sup>. Although DFOG and DFOB are linear tris-hydroxamate siderophores with the same tris-hydroxamate backbone as the cyclic nocardamine, this structural difference does not seem to affect recognition and transport by FoxA, because these compounds form a similar iron-binding shell as shown by the FoxA X-ray structures solved in complex with DFOB-Fe and nocardamine-Fe<sup>28,70</sup>. These structures show that NOCA-Fe and DFOB-Fe perfectly superimpose in the FoxA binding site, with the Fe atoms located in exactly the same position in both complexes, suggesting that DFOG could have a similar binding mode. Fluorescence titration experiments showed that the binding affinities for DFOB-Fe and nocardamine-Fe to FoxA are of the same order of magnitude. The dissociation constant (Kd) of nocardamine-Fe for FoxA is  $178 \pm 16$  nM, and that of DFOB-Fe is  $100 \pm 10$  nM, both forming 1:1 siderophore-Fe stoichiometry complexes with<sup>28,70</sup>. Additionally, the same team that solved the structures of FoxA also demonstrated, through structural and biophysical interaction studies, that ferri-DFOB binds to the transporter via a two-step TonB-binding mechanism<sup>70</sup>. The X-ray structure of the FoxA-bisucaberin-Fe complex has also been solved, showing that the bisucaberin-Fe complex is distinct from the two other siderophore-Fe complexes because it forms a 3:2 rather than a 1:1 siderophore-iron complex<sup>30</sup>. The X-ray structure also reveals that bisucaberin-Fe mimics the binding conformation of nocardamine-Fe but forms different hydrogen bonds with the transporter<sup>30</sup>. Chan et al. also demonstrated that extracellular loop 8 of FoxA plays a role in the binding and uptake of all three ligands<sup>30</sup>. It is also important to note that the thiopeptide antibiotic thiocillin, which has a different chemical structure than DFOB, nocardamine, and bisucaberin, also exploits FoxA for uptake. Molecular docking approaches suggest that thiocillin has a binding mode similar to that of nocardamine-Fe<sup>29,30</sup>. Thiocillin uses FoxA to cross the outer membrane and inhibit the growth of *P. aeruginosa*<sup>71</sup>. Our data show that the ferric forms of fusigen and coprogen are only recognized and transported by FpvB and not by FoxA. These compounds have unsaturations in their carbon chains, which can cause rigidities in their structures, affecting their interaction with FoxA.

The efficiency of <sup>55</sup>Fe uptake varies among the different xenosiderophores tested, between TAFC importing  $50 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}^{-1}$  and ferricrocin importing  $360 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}^{-1}$ . The lowest amount of <sup>55</sup>Fe imported is observed for the xenosiderophores using only FpvB for transport: TAFC, fusigen, ferrirubin, and coprogen (between  $50$  to  $100 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}^{-1}$ ). The highest amount of <sup>55</sup>Fe imported was observed for ferricrocin and ferrichrysin, which use both FpvB and FiuA ( $360$  and  $250 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}^{-1}$  respectively). It should be noted that this difference in the amount of <sup>55</sup>Fe imported into *P. aeruginosa* cells, depending on the xenosiderophore used, does not affect bacterial growth (Figs. 2, 3). At this stage, it is not possible to conclude whether FiuA has a higher uptake rate of ferri-siderophore complexes compared to FpvB and FoxA, or if the observed differences in the amount of imported <sup>55</sup>Fe are due to varying expression levels of these transporters. However, it is important to note that, according to genome annotation, *fpvB* transcription is solely regulated by Fur, whereas the transcription of *fiuA* and *foxA* is regulated by Fur and sigma/anti-sigma factors (FiuI/FiuR and FoxI/FoxR, respectively)<sup>63,65</sup>. Through RT-qPCR and proteomics approaches, we observed an induction of *foxA* transcription in the presence of DFOG and an induction of *fiuA* transcription and expression in the presence of ferricrocin, ferrichrysin, and RHODO. These regulations likely involve the sigma and anti-sigma factors FiuI/FiuR for *fiuA* and FoxI/FoxR for *foxA* (for more details concerning the molecular mechanisms involved, see <sup>63-65,72</sup>). It can be hypothesized that this positive regulation by sigma and anti-sigma factors results in a higher number of FoxA and FiuA transporters compared to FpvB in the outer membranes of *P. aeruginosa*. However, this remains a hypothesis and needs to be verified with additional studies quantifying the TBDTs in the membranes of *P. aeruginosa*.

This screening of nine different xenosiderophores already provides a good overview of the transport selectivities among FpvB, FiuA, and FoxA. These data also significantly extend the list of xenosiderophores that *P. aeruginosa* can utilize: 29 xenosiderophores are currently listed as usable by *P. aeruginosa* (Table S5 in Supplemental Materials). The broad transport selectivity of FpvB highlights the importance of obtaining the X-ray structure of this transporter to gain insight into the recognition and binding mechanisms between FpvB and various hydroxamate siderophores. With more than 40 structures of TBDTs currently described in the literature, elucidating



the structure of FpvB with different siderophores bound to its binding site(s) would help understand why this transporter, unlike other TBDTs, recognizes so many different siderophores. Given the low specificity of FpvB's recognition capabilities, this transporter could potentially be used to import siderophore-antibiotic conjugates. One of the major challenges in developing new antibiotics against Gram-negative bacteria is ensuring that these drugs can enter the bacterium to reach their biological targets. Due to the low binding and uptake selectivity of FpvB for hydroxamate-type siderophores, this transporter could serve as an entry point for siderophore-conjugated antibiotics (for reviews concerning this strategy, see Ref. 73–77). In addition, FpvB sequence is highly conserved in the various isolates of *P. aeruginosa* that have been fully sequenced: 99–100% sequence identity for 270 different isolates<sup>67</sup>, indicating that siderophore-antibiotic conjugates targeting this transporter could be used against many isolates of *P. aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* is a common opportunistic pathogen that can cause infections in immunocompromised individuals, particularly those with cystic fibrosis, burns, or compromised immune systems<sup>78,79</sup>. Fungi, including *Candida* species and *Aspergillus* species, are also known to cause opportunistic infections in similar patient populations<sup>80</sup>. Co-infections involving *P. aeruginosa* and fungi can occur in various clinical settings and often lead to more severe disease outcomes compared to infections with either pathogen alone<sup>81–83</sup>. The interactions between *P. aeruginosa* and fungi in co-infections are complex and can involve competition for nutrients, production of virulence factors, and modulation of host immune responses. Both *P. aeruginosa* and fungi produce and use siderophores to acquire iron from host tissues, competing for these essential resources. *P. aeruginosa* produces pyoverdine and pyochelin<sup>84–86</sup>. *Aspergillus* species, including *Aspergillus fumigatus*, produce siderophores such as ferricrocin and fusarinine C to acquire iron from the environment. In the context of co-infections, the production and utilization of siderophores by *P. aeruginosa* and fungi can influence the dynamics of microbial growth and virulence<sup>87</sup>. Moreover, using a neutropenic mouse model of microbial gastrointestinal colonization and dissemination, Lopez-Medina and collaborators demonstrated that the fungus *Candida albicans* inhibits the virulence of the bacterium *P. aeruginosa* by suppressing the expression of pyochelin and pyoverdine genes, which are critical for iron acquisition and virulence<sup>88</sup>. Furthermore, deletion of the *fiuA* gene in *P. aeruginosa* was shown to affect biofilm formation under sublethal carbenicillin stress conditions and to reduce the production of elastase, a major virulence determinant<sup>89</sup>. Understanding the interactions between *P. aeruginosa*, fungi, and siderophores in co-infections is crucial for developing strategies to prevent and treat infections caused by these pathogens and to combat multidrug-resistant infections in clinical settings.

*P. aeruginosa* is also known to coexist with various *Streptomyces* species and fungi in different environments, like soil and rhizosphere ecosystems, with synergistic or competitive interactions depending on the specific strains and environmental conditions<sup>90–92</sup>. One significant aspect of these interactions involves the production and utilization of siderophores. Each organism produces siderophores to scavenge iron from the surroundings, thereby reducing the availability of iron for the others. In some cases, as demonstrated in the present work for *P. aeruginosa* and in previous studies by Jurkevitch et al. on *P. aeruginosa* and *P. putida*<sup>32,93</sup>, *Pseudomonas* and fungi or *Streptomyces* may engage in cooperative interactions regarding siderophore production and utilization. Indeed, the siderophores produced by fungi and *Streptomyces* can be used by *P. aeruginosa*, leading to cooperative relationships where both partners benefit from increased iron acquisition. These interactions between *P. aeruginosa*, *P. putida*, fungi, *Streptomyces*, and the siderophores they produce are dynamic and can vary depending on factors such as environmental conditions, nutrient availability, and the specific microbial species involved. Understanding these interactions is important not only for elucidating microbial ecology but also for potential applications in agriculture, bioremediation, and medical microbiology.

In conclusion, we have demonstrated that *P. aeruginosa* can utilize the nine hydroxamate siderophores tested to access iron, with the TBDTs involved being FpvB, FiuA, FoxA and another unidentified TBDT. These TBDTs exhibit distinct transport selectivities: FpvB transports and imports ferric complexes of all nine siderophores tested, FiuA predominantly recognizes siderophores of the ferrichrome subtype, and FoxA recognizes those of the DFOB family. The expression of FiuA and FoxA is regulated by the absence of iron and the presence of the siderophores they transport, unlike FpvB, which appears to be consistently expressed at the same levels under iron-restricted conditions.

These findings (i) demonstrate that hydroxamate siderophores must play a key role in the dynamics of fungal-bacterial interactions, (ii) provide insights into the ecological balance of microbial communities, and (iii) may have implications for various fields, including agriculture and medicine, where iron availability plays a critical role in microbial pathogenesis and nutrient cycling. For example, our data suggest that FpvB could be an interesting transporter for facilitating the uptake of antibiotics via siderophore vectorization due to its broad binding and transport selectivity. Consequently, understanding the biochemistry and physiological roles of hydroxamate siderophores offers valuable insights into microbial iron homeostasis and opens avenues for the development of innovative strategies to combat bacterial infections.

## Methods

### Chemicals

The siderophores rhodotoluric acid (RHODO), coprogen, Desferrioxamine G (DFOG), Triacetylfusarinine C (TAFC), fusigen, ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin and ferrirubin were obtained from Biophore Research Products. The <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub> was purchased from Perkin Elmer Life and Analytical Science (Waltham, MA, USA) and the protonophore CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

### Bacterial strains and growth conditions

The *P. aeruginosa* strains used in this study are listed in Table S2 (Supplemental Materials). For all experiments in iron restricted conditions, the strains were first grown overnight in LB medium with shaking (220 rpm) at 30°C. Bacteria were then washed and resuspended in iron-restricted casamino acid (CAA) medium composed of 5 g l<sup>-1</sup> low-iron CAA (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA), 1.46 g l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O, and 0.25 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.

### Plasmids and strains construction

Enzymes were obtained from ThermoFisher Scientific and Eurofins Genomics and oligonucleotides used in this study are listed in Table S3 (Supplemental Materials). *Escherichia coli* TOP10 strain (Invitrogen, MS, USA) was used as the host strain for the plasmids. Plasmid construction and mutation in the chromosomal genome of *P. aeruginosa* were carried out as detailed before<sup>94</sup>. Briefly, 1400 bp of flanking sequences of the genes *fiuA*, *foxA* or *fpvB* were inserted into the suicide vector pEXG2 using a blunt-end ligation strategy. The plasmids were sequenced and then used to generate chromosomal mutations into *P. aeruginosa* strain. All deletion mutants were confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing.

### Growth assays in iron-restricted conditions

To monitor growth in microplates in the presence of hydroxamate siderophores, *P. aeruginosa* strains were first grown as described above. After an overnight culture in CAA medium at 30°C, bacteria cultures were then washed and resuspended in CAA medium at an optical density of 0,01 at 600 nm in 96-well plates (Greiner, U-bottom microplate, Frickenhausen, Germany) and in the presence or absence of 10 μM RHODO, coprogen, TAFC, fusigen, DFOG, ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin or ferrirubin<sup>50–52,94</sup>. Plates were incubated with shaking at 30°C, in a microplate reader (Infinite M200, Tecan). The bacterial growth was monitored every 30 min for 24 h by measuring the optical density at 600 nm. The data for each measurement represents the mean of three biological replicates.

### Iron uptake assay

As for the growth assay, *P. aeruginosa* strains were first grown overnight in LB broth, followed by a second overnight in CAA medium, all at 30°C. Bacterial cultures were then washed and resuspended in CAA medium at an optical density of 0,1 at 600 nm in the presence of 10 μM of one of the siderophores RHODO, coprogen, TAFC, fusigen, DFOG, ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin or ferrirubin to induce the expression of the corresponding TBDT<sup>54,50,60,61,65</sup>. Siderophore-<sup>55</sup>Fe complexes and <sup>55</sup>Fe uptake kinetics were carried out as described previously<sup>35</sup>. Briefly, the uptake of <sup>55</sup>Fe into *P. aeruginosa* cells was monitored for 3 h at a concentration of xenosiderophore-<sup>55</sup>Fe complexes of 500 nM, and in the presence or absence of 200 μM CCCP, a proton motive force inhibitor<sup>96</sup>. Xenosiderophore-<sup>55</sup>Fe complexes were prepared with the siderophore:iron (mol:mol) ratio of 20:1 for coprogen, TAFC, ferricrocin, ferrirhodin, ferrichrysin et ferrirubin, 30:1 for DFOG and 40:1 for RHODO and fusigen to avoid any <sup>55</sup>Fe precipitation because not chelated by the xenosiderophores.

### Quantitative real-time PCR

To monitor the expression of genes of interest, *P. aeruginosa*  $\Delta$ *pvdF* $\Delta$ *pchA* cells were grown as described above. After an overnight culture at 30°C in CAA medium, bacterial cultures were washed and resuspended in CAA medium at an optical density of 0,1 at 600 nm in the absence or presence of 10 μM of RHODO, coprogen, TAFC, fusigen, DFOG, ferricrocin, ferrichrysin, ferrirhodin or ferrirubin. After 8 h of incubation with shaking (220 rpm) at 30°C, 2.5 X 10<sup>8</sup> cells were harvested from each culture and 2 volumes of RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) was added. The RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) was used to extract total RNA from the pellet following the manufacturer instructions. 1 μg of RNA was reverse transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, Hercules, CA, USA). Expression of specific genes was measured in a CFX Opus 96 device (Biorad) using the iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad) and the appropriate primers (Table S4). The transcript levels were normalized using those of *uvrD* and *rpsL*. The data are expressed as a log<sub>2</sub> ratio (fold-change) relative to the reference condition and are collected from three biological replicates.

### Proteomic analysis

*P. aeruginosa*  $\Delta$ *pvdF* $\Delta$ *pchA* cells were grown as for quantitative real-time PCR experiment in the absence or presence of 10 μM of RHODO, ferricrocin or ferrichrysin. After 8 h of incubation at 30°C, 5 × 10<sup>8</sup> cells were collected and used for proteomic analysis. Each cell-culture condition was prepared in biological triplicates and the peptide mixture of every sample was prepared for injection as described previously<sup>31</sup>.

Ferricrocin treated and untreated samples were prepared and analyzed on a Qexactive Plus (Thermo-Fisher Scientific) mass spectrometer as described in<sup>50</sup>.

The RHODO and ferrichrysin treated and untreated samples were injected on a reversed phase nanoElute 2 coupled to a TIMS-TOF Pro 2 mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH) using a DDA-PASEF acquisition strategy. Peptides were separated on the integrated emitter column IonOpticks Aurora Elite (25 cm × 75 μM, 1.7 μm particle size and 120 Å pore size; AUR3–15075C18-CSI) with 70 min gradients.

Proteins were identified via comparison to the Uniprot, *P. aeruginosa* database (v2020\_04, strain PAO1, 5564 forward protein sequences) using Mascot algorithm (version 2.8, Matrix Science) with a decoy strategy. Mass error was set to 20 ppm for precursor ions and 30 ppm for fragment ions. Oxidation (M), carbamidomethylation FCR and its untreated controls (C) and acetylation (protein Nter) were considered as variable modifications. Data were then imported into Proline v2.0 software<sup>97</sup>, proteins were validated with a Mascot pretty rank equal to 1, a Mascot score threshold set at 25 and 1% FDR (False Discovery Rate) on both peptide spectrum matches

(PSM score) and protein sets (Protein Set score) and MS1 eXtracted Ion Chromatograms (XIC) were used to quantify each protein. An exhaustive map alignment followed by a median ratio normalization of the intensities was computed on Proline. A 50s cross assignment was carried out within groups only.

For the statistical analyses of the data, Prostar 1.26.4 was used. Partially observed values (POV) were imputed with structured least square adaptive regression (SLSA) method while values missing in the entire condition (MEC) were imputed with det quantile 1%. A LIMMA statistical test with a log (FC) threshold of 1 and a Benjamini–Hochberg correction were used to generate  $\log_2(\text{FC})$  and adjusted p-values. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD052483, Token: BLPXzP6mEmEX.

### Data availability

Proteomic data are available via ProteomeXchange with identifier PXD052483. Project accession: PXD052483 Token: BLPXzP6mEmEX.

Received: 13 June 2024; Accepted: 1 August 2024

Published online: 13 August 2024

### References

- Hider, R. Siderophore mediated absorption of iron. *Struct. Bond.* **58**, 28 (1984).
- Dev, S. & Babbitt, J. L. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial. Int.* **21**(Suppl 1), S6–S20 (2017).
- Kraemer, S. M. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat. Sci.* **66**, 3–18 (2004).
- Ellermann, M. & Arthur, J. C. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host–bacterial interactions. *Free Radic. Biol. Med.* **105**, 68–78 (2017).
- 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).
- Celia, H. *et al.* Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature* **538**, 60–65 (2016).
- 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).
- Celia, H., Noinaj, N. & Buchanan, S. K. Structure and stoichiometry of the ton molecular motor. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 375 (2020).
- Schalk, I. J. & Guillon, L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids* **44**, 1267–1277 (2013).
- Boukhalfa, H. & Crumbliss, A. L. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* **15**, 325–339 (2002).
- Zalkin, A., Forrester, J. D. & Templeton, D. H. Crystal and molecular structure of ferrichrome A. *Science* **146**, 261–263 (1964).
- Norrestam, R., Stensland, B. & Brändén, C. I. On the conformation of cyclic iron-containing hexapeptides: the crystal and molecular structure of ferrichrysin. *J. Mol. Biol.* **99**, 501–506 (1975).
- Raymond, K. N., Dertz, E. A. & Kim, S. S. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3584–3588 (2003).
- Konetschny-Rapp, S., Jung, G., Meiwes, J. & Zähler, H. Staphyloferrin A: A structurally new siderophore from *Staphylococci*. *Eur. J. Biochem.* **191**, 65–74 (1990).
- Welz, D. & Braun, V. Ferric citrate transport of *Escherichia coli*: functional regions of the FecR transmembrane regulatory protein. *J. Bacteriol.* **180**, 2387–2394 (1998).
- Silva, A. M., Kong, X., Parkin, M. C., Cammack, R. & Hider, R. C. Iron(III) citrate speciation in aqueous solution. *Dalton Trans.* **40**, 8616–8625 (2009).
- Demange, P. *et al.* Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol. Metals* **3**, 155–170 (1990).
- Gibson, F. & Magrath, D. I. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62–1. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **192**, 175–184 (1969).
- Lee, B. H. & Miller, M. J. Natural ferric ionophores: total synthesis of schizokinen, schizokinen A, and arthrobactin. *J. Org. Chem.* **48**, 24–31 (1983).
- Mullis, K. B., Pollack, J. R. & Neilands, J. B. Structure of schizokinen, An iron-transport compound from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* **10**, 4894 (1971).
- Winkelmann, G. Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands. *Mycol. Res.* **96**, 529–534 (1992).
- Renshaw, J. C. *et al.* Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycol. Res.* **106**, 1123–1142 (2002).
- Winkelmann, G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals* **20**, 379–392 (2007).
- Schalk, I. J. & Perraud, Q. *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environ. Microbiol.* **25**, 811–831 (2022).
- Cornelis, P. & Bodilis, J. A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**, 256–262 (2009).
- Schalk, I. J. & Cunrath, O. An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **18**, 3227–3246 (2016).
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L., Shanzer, A. & Schalk, I. J. The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome. *J. Bacteriol.* **192**, 1212–1220 (2010).
- 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).
- Chan, D. C. K. & Burrows, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* FpvB Is a High-Affinity Transporter for Xenosiderophore Ferrichrome and Ferrioxamine B. *mBio* **14**, e0314922 (2023).
- Chan, D. C. K. *et al.* Interactions of TonB-dependent transporter FoxA with siderophores and antibiotics that affect binding, uptake, and signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **120**, e2221253120 (2023).
- Will, V. *et al.* Siderophore specificities of the *Pseudomonas aeruginosa* TonB-dependent transporters ChtA and ActA. *FEBS Lett* **597**, 2963–2974 (2023).
- Jurkevitch, E., Hadar, Y. & Chen, Y. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 119–124 (1992).
- Winkelmann, G. Structural and stereochemical aspects of iron transport in fungi. *Biotechnol. Adv.* **8**, 207–231 (1990).
- Neilands, J. B. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**, 26723–26726 (1995).



35. Van Der Helm, D. & Winkelmann, G. Hydroxamates and Polycarboxylates as Iron Transport Agents (Siderophores) in Fungi. *Metal Ions in Fungi* (CRC Press, Boca Raton, 1994).
36. Carrano, C. J. & Raymond, K. N. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds: Rhodotorulic acid and iron uptake in *Rhodotorula pilimanae*. *J. Bacteriol.* **136**, 69–74 (1978).
37. Calvente, V., de Orellano, M. E., Sansone, G., Benuzzi, D. & Sanz de Tosetti, M. I. Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 226–229 (2001).
38. Wong, G. B., Kappel, M. J., Raymond, K. N., Matzanke, B. & Winkelmann, G. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 24. Characterization of coprogen and ferricrocin two ferric hydroxamate siderophores. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 810–815 (1983).
39. Hossain, M. B., Eng-Wilmot, D. L., Loghry, R. A. & Van der Helm, D. Circular dichroism, crystal structure, and absolute configuration of the siderophore ferric N, N', N''-triacylfusarinine,  $\text{Fe}_2\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{N}_{6}\text{O}_{15}$ . *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5766–5773 (1980).
40. Aguiar, M. *et al.* Uptake of the Siderophore Triacylfusarinine C, but Not Fusarinine C, Is Crucial for Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *mBio* **13**, e0219222 (2022).
41. Diekmann, H. & Zähner, H. Konstitution von Fusigen und dessen Abbau zu  $\Delta^2$ -Anhydromevalonsäurelacton. *Eur. J. Biochem.* **3**, 213–218 (1967).
42. Haselwandter, K. *et al.* Isolation and identification of hydroxamate siderophores of ericoid mycorrhizal fungi. *Biometals* **5**, 51–56 (1992).
43. Haselwandter, K. *et al.* Linear fusigen as the major hydroxamate siderophore of the ectomycorrhizal *Basidiomycota* *Laccaria laccata* and *Laccaria bicolor*. *Biometals* **26**, 969–979 (2013).
44. Reissbrodt, R., Rabsch, W., Chapeaurouge, A., Jung, G. & Winkelmann, G. Isolation and identification of ferrioxamine G and E in *Hafnia alvei*. *Biol. Metals* **3**, 54–60 (1990).
45. Jalal, M. A. *et al.* Extracellular siderophores from *Aspergillus ochraceus*. *J. Bact.* **158**, 683–688 (1984).
46. Fidelis, K., Hossain, M. B., Jalal, M. A. & van der Helm, D. Structure and molecular mechanics of ferrirhodin. *Acta. Crystallogr. C* **46**(Pt 9), 1612–1617 (1990).
47. Haselwandter, K. & Winkelmann, G. Ferricrocin—an ectomycorrhizal siderophore of *Cenococcum geophilum*. *Biometals* **15**, 73–77 (2002).
48. Konetschny-Rapp, S., Jung, G., Huschka, H.-G. & Winkelmann, G. Isolation and identification of the principal siderophore of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Biol. Metals* **1**, 90–98 (1988).
49. Munawar, A., Marshall, J. W., Cox, R. J., Bailey, A. M. & Lazarus, C. M. Isolation and characterisation of a ferrirhodin synthetase gene from the sugarcane pathogen *Fusarium sacchari*. *Chembiochem* **14**, 388–394 (2013).
50. Perraud, Q. *et al.* Phenotypic adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by hacking siderophores produced by other microorganisms. *Mol. Cell Proteomics* **19**, 589–607 (2020).
51. Perraud, Q. *et al.* Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **24**, 878–893 (2022).
52. Fritsch, S. *et al.* 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 (2022).
53. 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).
54. Cunrath, O., Geoffroy, V. A. & Schalk, I. J. Metalloids of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. *Environ. Microbiol.* **18**, 3258–3267 (2016).
55. Coy, M. & Neilands, J. B. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* **30**, 8201–8210 (1991).
56. Hassett, D. J. *et al.* Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J. Bacteriol.* **178**, 3996–4003 (1996).
57. Fillat, M. F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch. Biochem. Biophys.* **546**, 41–52 (2014).
58. Nader, S. *et al.* New insights into the tetrameric family of the Fur metalloregulators. *Biometals* **32**, 501–519 (2019).
59. Perraud, Q. *et al.* Phenotypic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in the Presence of Siderophore-Antibiotic Conjugates during Epithelial Cell Infection. *Microorganisms* **8**, 1820 (2020).
60. Heinrichs, D. E. & Poole, K. PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (*fpfA*) expression in *Pseudomonas aeruginosa*, functions both as an activator and as a repressor. *J. Bacteriol.* **178**, 2586–2592 (1996).
61. Dean, C. R., Neshat, S. & Poole, K. PchR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**, 5361–5369 (1996).
62. 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).
63. Llamas, M. A. *et al.* The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 1882–1891 (2006).
64. Llamas, M. A. *et al.* Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol. Microbiol.* **67**, 458–472 (2008).
65. 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**, 569–597 (2014).
66. Luscher, A. *et al.* Plant-derived catechols are substrates of TonB-dependent transporters and sensitize *Pseudomonas aeruginosa* to siderophore-drug conjugates. *MBio* **22** (2022).
67. Winsor, G. L. *et al.* *Pseudomonas* genome database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* **39**, D596–600 (2011).
68. Hider, R. C. & Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 637–657 (2011).
69. Ghysels, B. *et al.* FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**, 1671–1680 (2004).
70. 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).
71. Chan, D. C. K. & Burrows, L. L. Thiocillin and micrococin exploit the ferrioxamine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* for uptake. *J. Antimicrob. Chemother.* **76**, 2029–2039 (2021).
72. Bastiaansen, K. C., van Ulsen, P., Wijtmans, M., Bitter, W. & Llamas, M. A. Self-cleavage of the *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signaling anti-sigma factor FoxR occurs through an N-O acyl rearrangement. *J. Biol. Chem.* **290**, 12237–12246 (2015).
73. Mislin, G. L. A. & Schalk, I. J. Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics* **6**, 408–420 (2014).
74. Negash, K. H., Norris, J. K. S. & Hodgkinson, J. T. Siderophore-antibiotic conjugate design: New drugs for bad bugs?. *Molecules* **24**, E3314 (2019).
75. Pham, T.-N., Loupias, P., Dassonville-Klimpt, A. & Sonnet, P. Drug delivery systems designed to overcome antimicrobial resistance. *Med. Res. Rev.* **39**, 2343–2396 (2019).

76. Al Shaer, D., Al Musaimi, O., de la Torre, B. G. & Albericio, F. Hydroxamate siderophores: Natural occurrence, chemical synthesis, iron binding affinity and use as Trojan horses against pathogens. *Eur. J. Med. Chem.* **208**, 112791 (2020).
77. Southwell, J. W., Black, C. M. & Duhme-Klair, A.-K. Experimental methods for evaluating the bacterial uptake of Trojan Horse antibacterials. *ChemMedChem* **16**, 1063–1076 (2021).
78. Faure, E., Kwong, K. & Nguyen, D. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections: How to adapt within the host?. *Front. Immunol.* **9**, 2416 (2018).
79. Wood, S. J., Kuzel, T. M. & Shafikhani, S. H. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, animal modeling, and therapeutics. *Cells* **12**, 199 (2023).
80. Kelly, B. T., Pennington, K. M. & Limper, A. H. Advances in the diagnosis of fungal pneumonias. *Expert. Rev. Respir. Med.* **14**, 703–714 (2020).
81. Méar, J.-B. *et al.* *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: more than an opportunistic criminal association?. *Med. Mal. Infect.* **43**, 146–151 (2013).
82. Oliveira, M., Cunha, E., Tavares, L. & Serrano, I. *P. aeruginosa* interactions with other microbes in biofilms during co-infection. *AIMS Microbiol.* **9**, 612–646 (2023).
83. Kahl, L. J. *et al.* Interkingdom interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* affect clinical outcomes and antimicrobial responses. *Curr. Opin. Microbiol.* **75**, 102368 (2023).
84. Sass, G. *et al.* Studies of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Indicate Pyoverdine as the Central Factor in Inhibition of *Aspergillus fumigatus* Biofilm. *J. Bacteriol.* **200**, e00345–e417 (2017).
85. Sass, G. *et al.* *Aspergillus-Pseudomonas* interaction, relevant to competition in airways. *Med. Mycol.* **57**, S228–S232 (2019).
86. Schalk, I. J., Rigouin, C. & Godet, J. An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. *Environ. Microbiol.* **22**, 1447–1466 (2020).
87. Schrettl, M. *et al.* Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog.* **3**, 1195–1207 (2007).
88. Lopez-Medina, E. *et al.* *Candida albicans* Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* virulence through suppression of Pyochelin and Pyoverdine Biosynthesis. *PLoS Pathog.* **11**, e1005129 (2015).
89. Lee, K. *et al.* The ferrichrome receptor A as a new target for *Pseudomonas aeruginosa* virulence attenuation. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fw104 (2016).
90. Berg, G., Eberl, L. & Hartmann, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**, 1673–1685 (2005).
91. Braga, R. M., Dourado, M. N. & Araújo, W. L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Braz. J. Microbiol.* **47**, 86–98 (2016).
92. Babalola, O. O. *et al.* Rhizosphere microbiome cooperations: Strategies for sustainable crop production. *Curr. Microbiol.* **78**, 1069–1085 (2021).
93. Jurkevitch, E., Hadar, Y., Chen, Y., Libman, J. & Shnizer, A. Iron uptake and molecular recognition in *Pseudomonas putida*: receptor mapping with ferrichrome and its biomimetic analogs. *J. Bacteriol.* **174**, 78–83 (1992).
94. 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).
95. Hoegy, F. & Schalk, I. J. Monitoring iron uptake by siderophores. *Methods Mol. Biol.* **1149**, 337–346 (2014).
96. Clément, E., Mesini, P. J., Pattus, F., Abdallah, M. A. & Schalk, I. J. 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 (2004).
97. Bouyssié, D. *et al.* Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **36**, 3148–3155 (2020).

## Acknowledgements

Authors acknowledge the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for general financial support. This work was also supported by a CNRS grant (80/Prime 2020), a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR, grant number: ANR-22-CE44-0024-01), and a grant from the associations Vaincre la Mucoviscidose and Gregory Lemarchal (grant number: RF20230503252). We also acknowledge the Interdisciplinary Thematic Institute (ITI) InnoVec (Innovative Vectorization of Biomolecules, IdEx, ANR-10-IDEX-0002). The mass spectrometry instrumentation at the IBMC was funded by the Interdisciplinary Thematic Institute IMCBio+, as part of the ITI 2021–2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm, IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002), SFRI-STRAT<sup>US</sup> (ANR-20-SFRI-0012), and EUR IMCBio (ANR-17-EURE-0023) under the framework of the French Investments of the France 2030 Program as well as by EquipEx I2MC (ANR-11-EQPX-0022). Further funding supports were from the CPER 2021–2027 (ImaProGen Project) and the Strasbourg eurometropole. VW received a fellowship from the Ministry of Research and Education. We thank Anne Bonneau for providing the strain  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fpvB$ .

## Author contributions

VW, CF, and VN conducted the <sup>55</sup>Fe uptake assays, qRT-PCR, and bacterial growth assays. VW also conceptualized the experiments, prepared the manuscript figures, and participated in writing, review, and editing. FV generated some of the mutants used in the study. LK and JC performed the proteomic experiments and analyses, and contributed to writing, review, and editing. IJS conceptualized and supervised the biological experiments, contributed to writing, review, and editing the manuscript, and was responsible for funding acquisition and project administration. All authors reviewed the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69152-6>.

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

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



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

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

© The Author(s) 2024

# MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

## The Role of FoxA, FiuA, and FpvB in Iron Acquisition via Hydroxamate-Type Siderophores in *Pseudomonas aeruginosa*

Virginie Will<sup>1,2</sup>, Chloé FREY<sup>1,2</sup>, Vincent Normant<sup>1,2</sup>, Lauriane Kuhn<sup>3</sup>, Johana Chicher<sup>3</sup>, Florian Volck<sup>1,2</sup> and Isabelle J. Schalk<sup>1,2\*</sup>.

**Table S1 : Affinities of the different siderophores for Fe<sup>3+</sup>.**

The pFe value is a measure used to express the affinity of a ligand (such as a siderophore) for iron. The pFe value is defined as the negative logarithm (base 10) of the concentration of free iron ions in solution when the ligand is in equilibrium with iron:

$pFe(III) = -\log[Fe(III)_{aq}]$  when  $[Fe(III)]_T = 10^{-6}$  M;  $[L] = 10^{-5}$  M and pH = 7.4

$\log \beta_{110} = \log$  stability constant between Fe(III) and L.

Siderophore = L	Stoichiometry L : Fe(III)	pFe(III)	Log $\beta_{110}$	References
RHODO	3 : 2	21.8	21.55	1
Coprogen	1 : 1	27.5	30.2	2
T AFC	1 : 1	-	31.8	3
Fusigen	1 : 1	-	-	
Nocardamine	1 : 1	27.7	32.49	4
DFOB	1 : 1	26.6	30.6	5
DFOG	1 : 1	-	-	
Ferrichrome	1 : 1	25.2	29.07	2, 6
Ferricrocin	1 : 1	26.5	30.4	2
Ferrichrysin	1 : 1	25.8	29.96	6
Ferrirhodin / ferrirubin	1 : 1	-	-	

**Table S2. Strains and plasmids used in this study.**

Strains and plasmids	Collection ID	Relevant characteristics	Reference
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>			
PAO1	PAO1	Wild-type strain	Ref <sup>7</sup>
$\Delta pvdF\Delta pchA$	PAS283	PAO1; <i>pvdF</i> and <i>pchA</i> chromosomally deleted	Ref <sup>8</sup>
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fpvB$	PAS637	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> and <i>fpvB</i> chromosomally deleted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fiuA$	PAS534	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> and <i>fiuA</i> chromosomally deleted	Ref <sup>9</sup>
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta foxA$	PAS535	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , and <i>foxA</i> chromosomally deleted	Ref <sup>9</sup>
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fiuA\Delta foxA$	PAS536	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , <i>fiuA</i> and <i>foxA</i> chromosomally deleted	Ref <sup>9</sup>
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fiuA\Delta fpvB$	PAS799	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , <i>fiuA</i> and <i>fpvB</i> chromosomally deleted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta foxA\Delta fpvB$	PAS800	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , <i>foxA</i> and <i>fpvB</i> chromosomally deleted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fiuA\Delta foxA\Delta fpvB$	PAS801	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , <i>fiuA</i> , <i>foxA</i> and <i>fpvB</i> chromosomally deleted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fiuA\Delta foxA\Delta fpvB$ $\Delta chtA$	PAS851	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , <i>fiuA</i> , <i>foxA</i> , <i>fpvB</i> and <i>chtA</i> chromosomally deleted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fiuA\Delta foxA\Delta fpvB$ $\Delta chtA\Delta PA0151$	PAS853	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , <i>fiuA</i> , <i>foxA</i> , <i>fpvB</i> , <i>chtA</i> and <i>PA0151</i> chromosomally deleted	This study
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
TOP10		F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 $\lambda$ -	Invitrogen
<b>Plasmids</b>			
pEXG2	pEXG2	allelic exchange vector with pBR origin, gentamicin resistance, sacB	Ref <sup>10</sup>
pEXG2 $\Delta fpvB$	pAB35	pEXG2 carrying the sequence to delete <i>fpvB</i>	This study
pEXG2 $\Delta chtA$	pSF07	pEXG2 carrying the sequence to delete <i>chtA</i>	Ref <sup>11</sup>
pEXG2 $\Delta PA0151$	pSF18	pEXG2 carrying the sequence to delete <i>PA0151</i>	This study

**Table S3. Primers used for the construction of the strains described in this study**

Oligonucleotides	Gene	Sequence
DelFpvB-500UpHindIII	<i>fpvB</i>	CCGGAAGCTTGCGCGGCCGATATCCGCCTCGTTGCCGTAG
DelFpvB-500DoBamH1	<i>fpvB</i>	GAGGCGGGTGTCTGTTTTCATGAACGGCGGATCCCCGG
Del ATG-FpvB – rev	<i>fpvB</i>	ACTGGAAACGACGTGTTTCATCTGCAGTGCCT
Del Stop-FpvB – fw	<i>fpvB</i>	ACACTGCAGATGAAACACGTCTGTTTCCAGTCTGATGTTACG GTGAAGTACTCGCTCTGA
PA4675Start-784 pb EcoRI	<i>chtA</i>	AAAAGAATTAGTAACGCCCCAGACGAATCG
PA4675Start + 18 pb overlap	<i>chtA</i>	CAGGCTGTAGGTCCGCCCCAGGGGAGCCGGGCG
PA4675Stop + 714 pb HindIII	<i>chtA</i>	AAAAAAGCTTCAAACGAGGGGCATGCCATG
PA4675Stop -18 pb	<i>chtA</i>	GGGCGGACCTACAGCCTG
pEXG2PA0151 Fw	<i>PA0151</i>	CGTCGATACGCACGCGCACCCGAGAAGCTTGCTTTACATTTA TGCTCCG
pEXG2PA0151 Rev	<i>PA0151</i>	GCAGGCCCTGCGCGACGGCAGGTCTAGAGGATCCCC
PA0151 STOP+700 Rev	<i>PA0151</i>	GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCCGTCGCGCAGGGCCTGC
PA0151 START -700 Fw	<i>PA0151</i>	CGGAAGCATAAATGTAAAGCAAGCTTCTGCGGTGCGCGTGC GTATCGACG

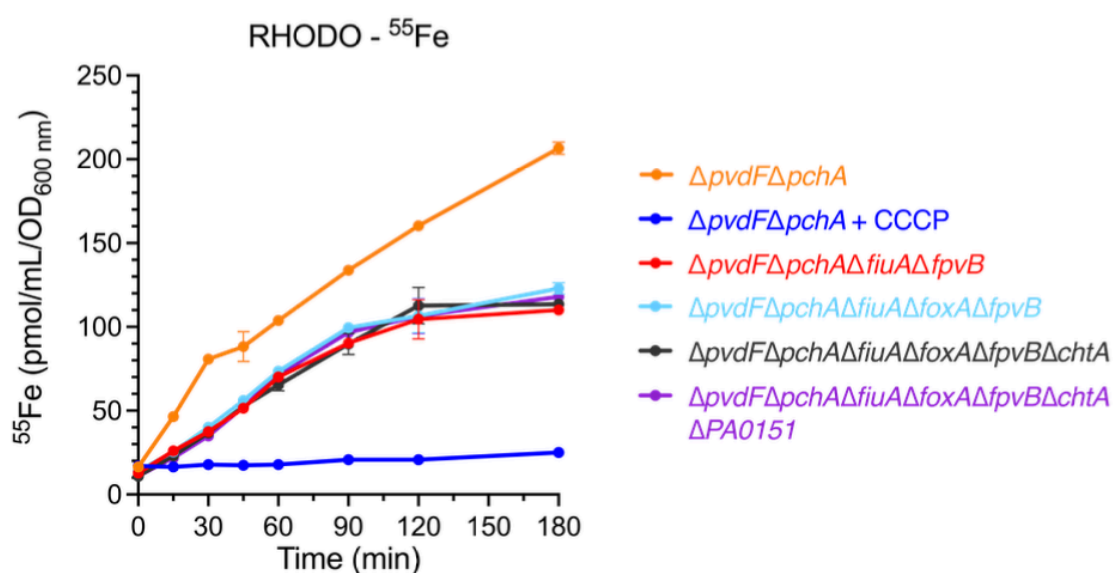
**Table S4. Primers used for RT-qPCR experiments.**

<b>Oligonucleotides</b>	<b>Sequence (5' to 3')</b>
<i>uvrD</i> F	CTACGGTAGCGAGACCTACAACAA
<i>uvrD</i> R	GCGGCTGACGGTATTGGA
<i>rpsL</i> F	TACACCACCACGCCGAAAA
<i>rpsL</i> R	CACCACCGATGTACGAGGAA
<i>fpvA</i> F	AGCCGCCTACCAGGATAAGC
<i>fpvA</i> R	TGCCGTAATAGACGCTGGTTT
<i>fpvB</i> F	GGTGATCTACGACCTGAACCA
<i>fpvB</i> R	GCTCTGCGGCTTGAAGATGT
<i>fptA</i> F	GCGCCTGGGCTACAAGATC
<i>fptA</i> R	CCGTAGCGGTTGTTCCAGTT
<i>foxA</i> F	AAGGGCTCGGATACCCAGTT
<i>foxA</i> R	CGTTGGGATCGTGTTGCA
<i>fiuA</i> F	GCCGCGACAAGAAGTTCAG
<i>fiuA</i> R	ACGACTCCGCATAGGAGATATAGG

**Table S5. TBDTs present in the *P. aeruginosa* PAO1 genome.** TBDTs for which the transcription is regulated by sigma/anti-sigma factors are highlighted in orange, by two component systems in green, by AraC regulators in pink, and by an IclR-type regulator in blue.

Gene	Name	Ligand	Reference
PA0151	-	-	
PA0192	-	-	
PA0434	-	-	
PA0470	FiuA	Ferrichrome, Ferricrocin, Ferrichrysin, Rhodotoluric acid	Ref <sup>12,13</sup> and present work
PA0781	-	-	
PA0931	PirA	Mono catechol (i.e., dopamine, norepinephrine, epinephrine, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, luteolin, ...)	Ref <sup>14-16</sup>
PA1271	BtuB	Cobalamine	Ref <sup>17</sup>
PA1302	HxuA	Haem	Ref <sup>18</sup>
PA1322	PfuA	-	Ref <sup>17</sup>
PA1365	-	-	
PA1613	-	-	
PA1910	FemA	Mycobactins, Carboxymycobactins	Ref <sup>19</sup>
PA1922	CirA	Zn	Ref <sup>20</sup>
PA2057	SppR	-	Ref <sup>21</sup>
PA2070	-	-	
PA2089	-	-	
PA2289	-	-	
PA2335	OptO	-	
PA2398	FpvA	Pyoverdine	Ref <sup>22</sup>
PA2466	FoxA	Desferrioxamine B, Desferrioxamine G, Nocardamine, Bisucaberin	Ref <sup>9,23,24</sup> and present work
PA2590	-	-	
PA2688	PfeA	Enterobactin	Ref <sup>25</sup>
PA2911	-	Zn	Ref <sup>20</sup>
PA3268	ActA	Rhizoferrin, Staphyloferrin A	Ref <sup>11</sup>
PA3408	HasR	HasAp-haem	Ref <sup>26</sup>
PA3790	OprC	Copper	Ref <sup>27</sup>
PA3901	FecA	Citrate	Ref <sup>28</sup>
PA4156	FvbA	Vibriobactin	Ref <sup>29</sup>

PA4168	FpvB	Pyoverdine, Ferrichrome, Ferricrocin, Ferrichrysin, Rhodotoluric acid, Desferrioxamine B, Desferrioxamine G, Triacetylfusarinine C, Coprogen, Fusigen, Ferrirubin, Ferrirhodin	Ref <sup>13,30</sup> and present work
PA4221	FptA	Pyochelin	Ref <sup>31</sup>
PA4514	PiuA	Mono catechol (i.e., dopamine, norepinephrine, epinephrine, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, luteolin, ...)	Ref <sup>15,16,32</sup>
PA4675	ChtA	Aerobactin, Rhizobactin, Schizokinens, Arthrobactin	Ref <sup>11</sup>
PA4710	PhuR	Haem	Ref <sup>26</sup>
PA4837	CntO	Pseudopaline (Zn)	Ref <sup>33</sup>
PA4897	OptI	-	



**Figure SM1: <sup>55</sup>Fe uptake by *P. aeruginosa* strains mediated by RHODO.** <sup>55</sup>Fe uptake assay carried out as in Figure 3 but with other TBDTs mutants.

## REFERENCES

1. Carrano, C. J., Cooper, S. R. & Raymond, K. N. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 11. Solution equilibria and electrochemistry of ferric rhodotorulate

- complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 599–604 (1979).
2. Wong, G. B., Kappel, M. J., Raymond, K. N., Matzanke, B. & Winkelmann, G. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 24. Characterization of coprogen and ferricrocin, two ferric hydroxamate siderophores. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 810–815 (1983).
  3. Adjimani, J. P. & Emery, T. Iron uptake in *Mycelia sterilia* EP-76. *J. Bacteriol.* **169**, 3664–3668 (1987).
  4. Anderegg, G., L'Eplattenier, F. & Schwarzenbach, G. Hydroxamatkomplexe II. Die Anwendung der pH-Methode. *Helv. Chim. Acta* **46**, 1400–1408 (1963).
  5. Schwarzenbach, G. & Schwarzenbach, K. Hydroxamatkomplexe I. Die Stabilität der Eisen(III)-Komplexe einfacher Hydroxamsäuren und des Ferrioxamins B. *Helv. Chim. Acta* **46**, 1390–1400 (1963).
  6. 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).
  7. Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–64 (2000).
  8. 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).
  9. 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).
  10. 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).
  11. Will, V. *et al.* Siderophore specificities of the *Pseudomonas aeruginosa* TonB-dependent transporters ChtA and ActA. *FEBS Lett.* **597**, 2963–2974 (2023).
  12. Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L., Shanzer, A. & Schalk, I. J. The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome. *J. Bacteriol.* **192**, 1212–20 (2010).
  13. Chan, D. C. K. & Burrows, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* FpvB Is a High-Affinity Transporter for Xenosiderophores Ferrichrome and Ferrioxamine B. *mBio* **14**, e0314922 (2023).
  14. Ghysels, B. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* *pirA* gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholates analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**, 167–74 (2005).
  15. Perraud, Q. *et al.* Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **24**, 878–893 (2022).



16. Luscher, A. *et al.* Plant-Derived Catechols Are Substrates of TonB-Dependent Transporters and Sensitize *Pseudomonas aeruginosa* to Siderophore-Drug Conjugates. *mBio* **13**, e0149822 (2022).
17. Cornelis, P. & Bodilis, J. A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**, 256–62 (2009).
18. Otero-Asman, J. R., García-García, A. I., Civantos, C., Quesada, J. M. & Llamas, M. A. *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem. *Environ. Microbiol.* **21**, 4629–4647 (2019).
19. Llamas, M. A. *et al.* Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol. Microbiol.* **67**, 458–72 (2008).
20. Pederick, V. G. *et al.* ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **5**, 13139 (2015).
21. Pletzer, D., Braun, Y. & Weingart, H. Swarming motility is modulated by expression of the putative xenosiderophore transporter SppR-SppABCD in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Antonie Van Leeuwenhoek* **109**, 737–753 (2016).
22. Poole, K., Neshat, S. & Heinrichs, D. Pyoverdine-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **62**, 1–5 (1991).
23. Llamas, M. A. *et al.* The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 1882–91 (2006).
24. Chan, D. C. K. *et al.* Interactions of TonB-dependent transporter FoxA with siderophores and antibiotics that affect binding, uptake, and signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **120**, e2221253120 (2023).
25. Poole, K., Young, L. & Neshat, S. Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **172**, 6991–6 (1990).
26. Smith, A. D. & Wilks, A. Differential contributions of the outer membrane receptors PhuR and HasR to heme acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **290**, 7756–7766 (2015).
27. Bhamidimarri, S. P. *et al.* Acquisition of ionic copper by the bacterial outer membrane protein OprC through a novel binding site. *PLoS Biol.* **19**, e3001446 (2021).
28. Marshall, B., Stintzi, A., Gilmour, C., Meyer, J.-M. & Poole, K. Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology* **155**, 305–315 (2009).
29. Elias, S., Degtyar, E. & Banin, E. FvbA is required for vibriobactin utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **157**, 2172–80 (2011).
30. Ghysels, B. *et al.* FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**, 1671–80 (2004).
31. Ankenbauer, R. G. & Quan, H. N. FptA, the Fe(III)-pyochelin receptor of *Pseudomonas aeruginosa*: a phenolate siderophore receptor homologous to hydroxamate siderophore receptors. *J. Bacteriol.* **176**, 307–19 (1994).
32. 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**, e02531-16 (2017).

33. Lhospice, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Sci. Rep.* **7**, 17132 (2017).

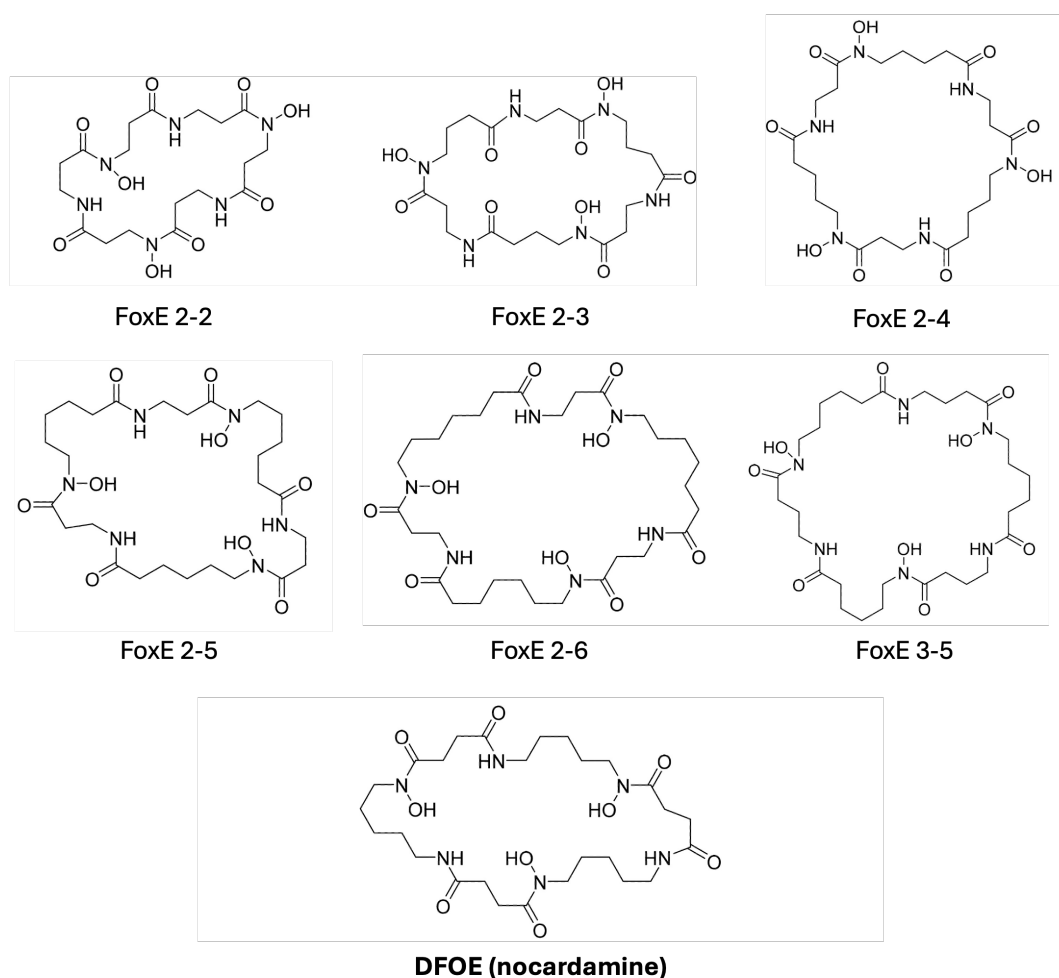
## 1.2 Dérivés synthétiques de la NOCA

### 1.2.1 Introduction du projet

Face à l'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques, il devient impératif de développer de nouvelles approches, non seulement pour le traitement des infections, mais également pour leur détection précoce. Dans cette optique, l'identification de radiotraceurs spécifiques constitue une stratégie prometteuse pour améliorer le diagnostic des infections bactériennes. Les sidérophores se révèlent être de bons candidats pour le développement de sondes moléculaires en imagerie médicale, notamment en raison de leur capacité à chélater d'autres ions métalliques que le fer, comme le Gallium (III) (Braud *et al.*, 2009). Cette caractéristique permettrait donc leur utilisation en tomographie par émission de positons (PET), notamment en combinaison avec l'isotope  $^{68}\text{Ga}$ , dont le court temps de désintégration (68 min) et le faible rayonnement en font un agent d'imagerie sûr et efficace (Bartholomä *et al.*, 2010).

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Elzbieta Gumienna-Kontecka, de l'université de Wrocław (Pologne), nous nous sommes intéressés à des analogues cycliques de la NOCA, également appelée desferrioxamine E (DFOE), un sidérophore de type hydroxamate à structure cyclique. L'utilisation de telles molécules comme agents radiomarqués potentiels nécessite toutefois une optimisation de leurs propriétés chimiques, afin de garantir leur stabilité et leur compatibilité pour une utilisation *in vivo*. Dans cette perspective, Andrzej Mular, doctorant au sein de l'équipe du Pr. Elzbieta Gumienna-Kontecka, a entrepris la synthèse chimique de dérivés cycliques de la DFOE. Ces dérivés présentent des variations dans la taille du cycle, tout en conservant les propriétés chélatrices pour les ions Fe (III) et Ga (III) (Figure 55). Un premier article, publié en 2021, rapporte la synthèse chimique de six analogues cycliques de la DFOE : FoxE 2-2, FoxE 2-3, FoxE 2-4, FoxE 2-5, FoxE 2-6 et FoxE 3-5 (Figure 55) (Mular *et al.*, 2021). La nomenclature utilisée reflète le nombre d'atomes de carbone séparant les groupes hydroxamate-amide-hydroxamates. Parmi ces analogues, FoxE 2-6 et FoxE 3-5 diffèrent uniquement par la nature de leurs groupements de liaison, conférant à FoxE 2-6 un caractère plus hydrophobe (Figure 55). Il a également été démontré que ces dérivés chélatent toujours les ions Fe (III) et Ga (III), et peuvent être utilisés comme sidérophores par *S. aureus*. Ces molécules possèdent donc toutes les caractéristiques pour être utilisées comme vecteurs pour des applications diagnostiques (Mular *et al.*, 2021). S'inscrivant dans la continuité de ces

travaux, notre étude visait à déterminer si les six dérivés cycliques de la DFOE sont reconnus et utilisés par *P. aeruginosa* pour accéder au fer, en vue de leur utilisation potentielle comme radiotraceurs. Notre objectif était également d'identifier le ou les TBDTs impliqués dans le transport de ces analogues.



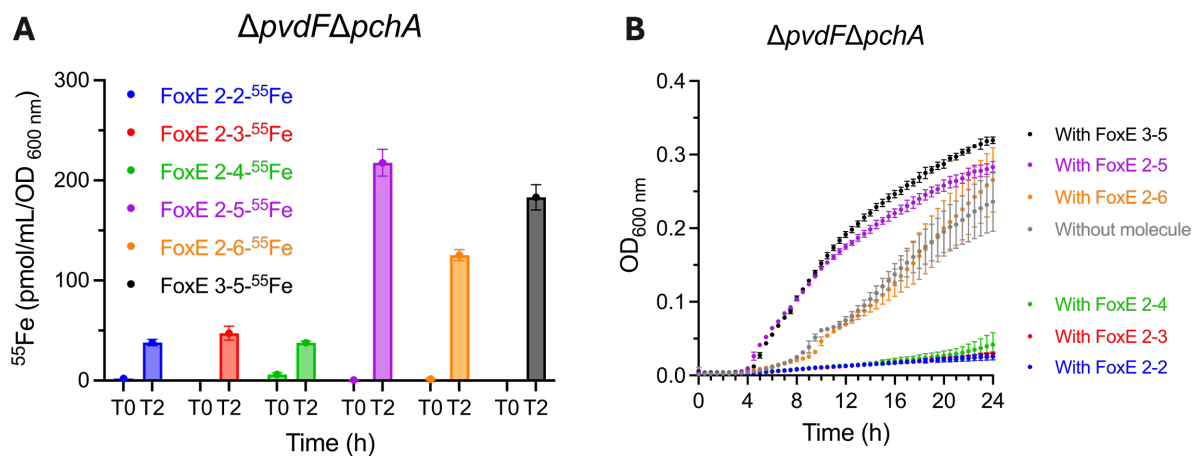
**Figure 55 :** Structure chimique de la desferrioxamine E (DFOE) et de ses analogues structuraux cycliques synthétisés par l'équipe du Pr. Elzbieta Gumienna-Kontecka.

### 1.2.2 Résultats

#### **FoxE 2-5, 2-6 et 3-5 sont capables d'importer le fer dans les cellules de *P. aeruginosa***

Afin de vérifier la capacité des analogues de la DFOE (NOCA) à importer le fer dans les cellules de *P. aeruginosa*, deux approches expérimentales ont été utilisées : l'une reposant sur la mesure de l'incorporation de fer radioactif ( $^{55}\text{Fe}$ ), l'autre sur l'analyse de la croissance bactérienne en conditions de carence en fer. Ces deux méthodes ont été décrites dans la partie précédente concernant l'étude des xénosidérophores de type hydroxamate (Will *et al.*, 2024). Dans le premier test, les six analogues

testés ont été chargés en  $^{55}\text{Fe}$  par incubation avec du  $^{55}\text{FeCl}_3$ . Les complexes  $^{55}\text{Fe}$ -sidérophore ainsi obtenus ont ensuite été incubés pendant deux heures avec une souche de *P. aeruginosa* incapable de produire ses sidérophores endogènes PVD et PCH ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ). L'utilisation de cette souche permet d'exclure toute interférence liée à l'acquisition de  $^{55}\text{Fe}$  par les sidérophores produits par la bactérie elle-même. Des aliquots ont été prélevés aux temps  $T_0$  et après deux heures d'incubation ( $T_2$ ), puis les cellules ont été récupérées par centrifugation et la radioactivité accumulée dans les bactéries a été quantifiée (Figure 56A). Les résultats indiquent que les composés FoxE 2-5, FoxE 2-6 et FoxE 3-5 permettent respectivement l'incorporation de 218, 125 et 183 pmoles de  $^{55}\text{Fe}$  par mL et par unité d'absorbance optique à 600 nm (pmoles/mL/OD<sub>600 nm</sub>), révélant leur capacité à agir comme sidérophores chez *P. aeruginosa*. En revanche, aucune accumulation significative de  $^{55}\text{Fe}$  n'a été observée pour les trois autres composés FoxE2-2, FoxE2-3 et FoxE2-4.



**Figure 56 :** Acquisition du fer par *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  en présence des analogues de DFOE. **A. Suivi de l'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$ .** Les cellules de *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$ , cultivées en condition de carence en fer, ont été incubées en présence de l'un des six analogues de la DFOE complexé avec du  $^{55}\text{Fe}$ . Des aliquots ont été prélevés aux temps  $T_0$ , directement après l'ajout des complexes de  $^{55}\text{Fe}$  et après deux heures d'incubation ( $T_2$ ). Les bactéries ont été récupérées par centrifugation et la radioactivité accumulée a été quantifiée. **B. Croissance bactérienne en condition de carence en fer.** Les cellules de *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  ont été cultivées en condition de carence en fer, en présence de 10  $\mu\text{M}$  de l'un des six analogues de la DFOE. La densité optique (OD) à 600 nm a été suivie en fonction du temps. Pour les deux panels, les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats biologiques.

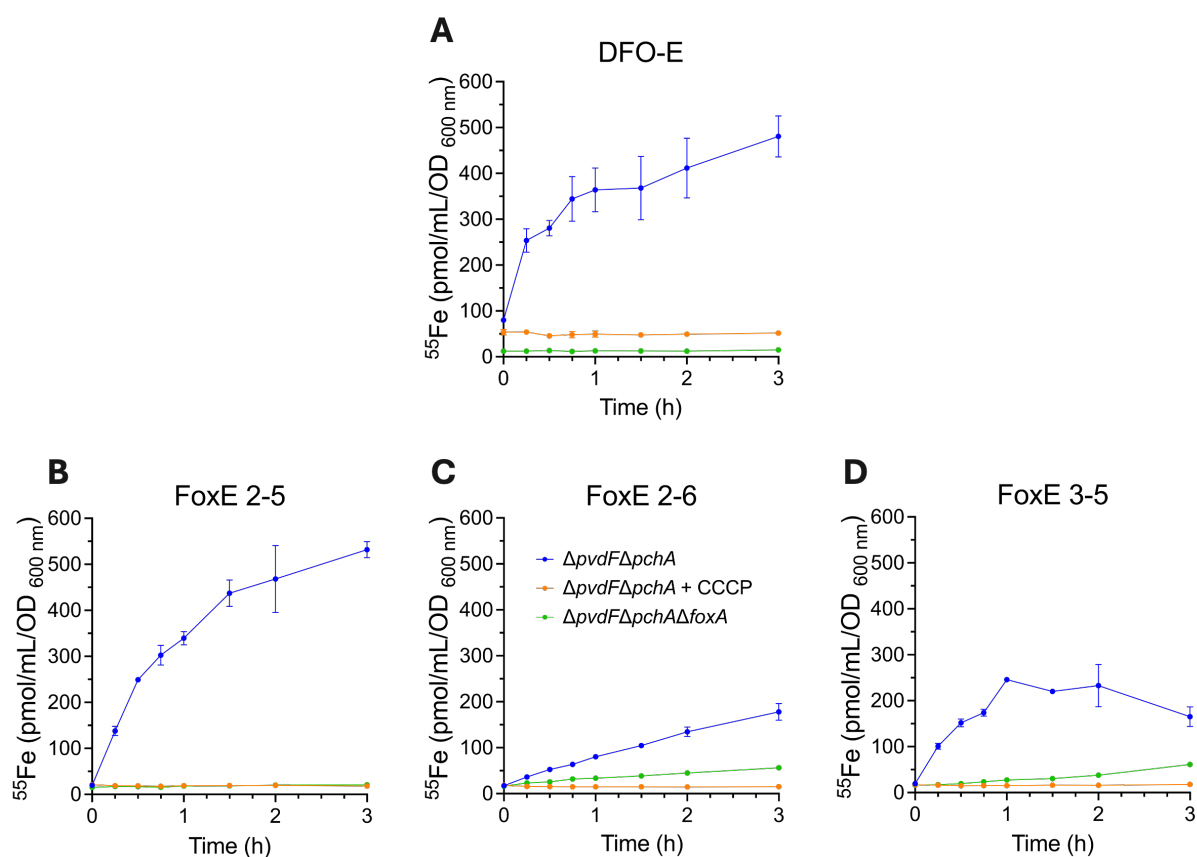
Pour le test de croissance bactérienne en condition de carence en fer (Figure 56B), la même souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$ , incapable de produire ses sidérophores, a été cultivée dans un milieu carencé en fer (milieu CAA) contenant environ 20 nM de fer, en présence de 10  $\mu\text{M}$  de l'un des six analogues de DFOE. Dans ces conditions de culture, tout le fer présent dans le milieu est chélaté par les composés ajoutés, contraignant la bactérie à utiliser exclusivement ces molécules pour accéder au fer. Dans ce

contexte, la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$  a été capable de croître uniquement en présence des composés FoxE 2-5, FoxE 2-6 et FoxE 3-5, mais pas en présence de FoxE 2-2, FoxE 2-3 ni FoxE 2-4. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors du suivi de l'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$  dans les bactéries au cours du temps, confirmant que les composés FoxE 2-5, FoxE 2-6 et FoxE 3-5 peuvent être utilisés comme sidérophores par *P. aeruginosa* pour accéder au fer de l'environnement.

### **FoxA est le TBDT impliqué dans l'acquisition du fer par les sidérophores FoxE 2-5, 2-6 et 3-5 chez *P. aeruginosa***

Les expériences de suivi de l'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$  et de croissance décrites précédemment ont également été utilisées pour identifier le ou les TBDT(s) impliqué(s) dans l'acquisition du fer par les analogues de la DFOE chez *P. aeruginosa*. Étant donné que la DFOE utilise FoxA pour importer le fer dans les cellules bactériennes (Normant *et al.*, 2020), ces expériences ont été réalisées sur des souches incapables de produire la PVD et la PCH et délétées du gène *foxA* ( $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta foxA$ ). Nous avons également souhaité vérifier si, comme pour la DFOB et la DFOG, FpvB n'était pas impliqué dans le transport de ces analogues chez *P. aeruginosa* (Chan and Burrows, 2022; Will *et al.*, 2024).

Concernant l'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$ , le composé FoxE 2-5 présente une cinétique d'acquisition du  $^{55}\text{Fe}$  au cours du temps similaire à celle observée pour la DFOE (Figure 57A-B). Cette accumulation n'est pas observée lorsque les cellules de  $\Delta pvdF\Delta pchA$  sont traitées avec le CCCP, un inhibiteur de la force proton-motrice, bloquant tout transport dépendant de la machinerie TonB (Clément *et al.*, 2004). Ces données indiquent que l'acquisition du fer résulte bien d'un mécanisme actif dépendant du gradient de protons. La délétion du gène *foxA* abolit totalement l'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$  en présence de FoxE 2-5 (Figure 57B), comme cela avait été montré précédemment dans le cas de la DFOE (Normant *et al.*, 2020), confirmant que les complexes ferriques de FoxE 2-5 sont importés dans le périplasme par le TBDT FoxA. Pour FoxE 2-6 et FoxE 3-5, la quantité de  $^{55}\text{Fe}$  incorporée dans les cellules au cours du temps est sensiblement inférieure à celle observée dans le cas de la DFOE et de FoxE 2-5 (Figure 57). La délétion de *foxA* abolit également presque totalement l'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$ , ce qui permet de conclure que ces deux composés utilisent également FoxA pour assurer le transport du fer dans les cellules de *P. aeruginosa* (Figure 57C-D).



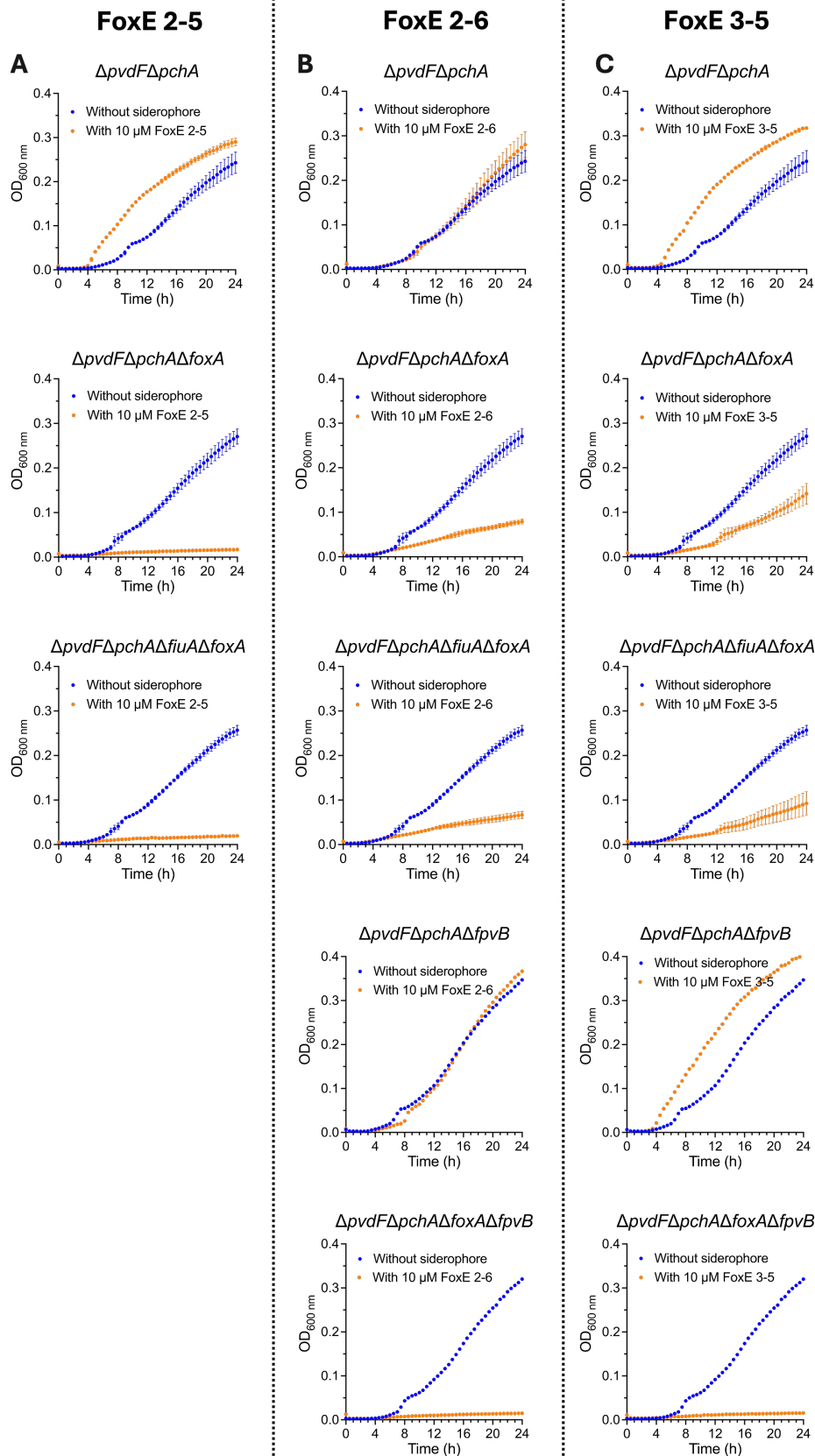
**Figure 57 :** Acquisition du  $^{55}\text{Fe}$  chez *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  et délétée de *foxA* en présence des analogues de la DFOE. Les cellules ont été cultivées dans un milieu carencé en fer et incubées en présence de l'un des trois analogues de la DFOE complexé au  $^{55}\text{Fe}$ . Des aliquots ont été prélevés à différents temps d'incubation, puis les culots bactériens ont été récupérés afin de mesurer la radioactivité accumulée dans les bactéries. La même expérience a été répétée avec la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$  en présence du protonophore CCCP, dans le but d'inhiber tout transport dépendant de la machinerie TonB. En bleu, la cinétique observée pour la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$ , en orange, la même souche mais traitée avec le CCCP et en vert, le mutant  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta foxA$ . Les données représentent la moyenne de trois réplicats biologiques.

Concernant les expériences de croissance en condition de carence en fer et en présence de  $10\ \mu\text{M}$  de FoxE 2-5 (Figure 58A), nous avons observé que la délétion du gène *foxA* abolit totalement la croissance bactérienne, confirmant ainsi l'implication de ce TBDT dans l'acquisition du fer via FoxE 2-5. Pour les composés FoxE 2-6 et FoxE 3-5, la délétion de *foxA* entraîne une inhibition de la croissance de respectivement 71 % et 48 %, suggérant que ces composés complexés au fer sont majoritairement transportés dans le périplasma par FoxA, mais qu'un autre TBDT est également impliqué (Figure 58B et C). La délétion de *fiuA* dans la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fiuA\Delta foxA$  n'entraîne aucune inhibition supplémentaire de la croissance. FiuA, un TBDT impliqué dans l'acquisition du fer par les sidérophores de type hydroxamate DFOB et ferrichrome (Normant *et al.*, 2020), ne semble donc pas impliqué dans l'acquisition du fer *via* FoxE 2-6 et FoxE 3-5. En revanche, la délétion de *fpvB*

dans la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta foxA\Delta fpvB$  conduit à une inhibition totale de la croissance bactérienne au cours du temps, indiquant que FpvB constitue le second TBDT impliqué dans l'import du fer par FoxE 2-6 et FoxE 3-5 (Figure 58B et C). Ces résultats n'ont toutefois pas pu être confirmés par le suivi de l'accumulation de  $^{55}\text{Fe}$  dans les bactéries au cours du temps, en raison de la quantité limitée de molécules testées.

Pris dans l'ensemble, ces résultats démontrent clairement que FoxA est le seul TBDT impliqué dans l'acquisition du fer *via* le composé FoxE 2-5. Dans le cas de FoxE 2-6 et FoxE 3-5, FoxA joue un rôle majeur dans l'import de leur forme ferrique, mais un second TBDT, FpvB, est également impliqué. L'efficacité de transport varie entre ces trois composés, suggérant que FoxA ne les reconnaît probablement pas tous avec la même affinité, ou que le transport *via* FpvB est moins efficace que celui assuré par FoxA. Les interactions entre les complexes ferriques de FoxE 2-6 et FoxE 3-5 et le site de liaison de FoxA pourraient en effet être moins favorables que celles observées avec FoxE 2-5 ou la DFOE (NOCA). Il est probable que la taille variable du macrocyclique des analogues de la DFOE génère des contraintes géométriques différentes dans la coordination du fer ferrique, influençant ainsi la reconnaissance du complexe par le site de liaison de FoxA, et permettant une reconnaissance et une interaction avec FpvB. Par ailleurs, ces analogues pourraient également présenter des affinités variables pour FoxB, la réductase de la membrane interne responsable de la libération du fer de la DFOE (Josts *et al.*, 2021), ce qui pourrait également contribuer à une efficacité de transport réduite des complexes ferriques des analogues de la DFOE.



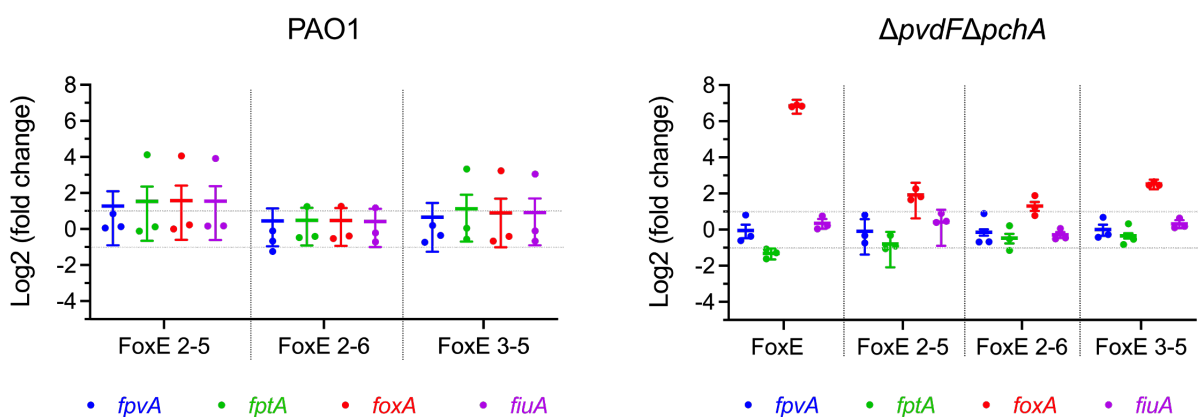


**Figure 58** : Suivi de la croissance bactérienne en condition de carence en fer. Les cellules de *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  et délétées des gènes *foxA*, *fiuA* et *fpvB* ont été cultivées en milieu carencé en fer en absence ou en présence de 10  $\mu\text{M}$  de l'un des trois analogues de la DFOE. La DO à 600 nm a été suivie au cours du temps et les données représentent la moyenne de trois réplicats biologiques.

## Tous les composés induisent la transcription de *foxA*

Des études antérieures ont montré que la présence de xénosidérophores dans l'environnement de *P. aeruginosa* induit la transcription et l'expression des gènes codant pour les TBDTs responsables de l'import de la forme ferrique de ces composés (Normant *et al.*, 2020, 2021; Perraud, Cantero, *et al.*, 2020). Par exemple, la présence de 10  $\mu\text{M}$  de DFOE ou DFOB induit fortement la transcription et l'expression de *foxA* (Normant *et al.*, 2020). Afin d'évaluer la capacité des analogues FoxE 2-5, FoxE 2-6 et FoxE 3-5 à induire la transcription de *foxA*, les souches PAO1 (WT) et  $\Delta pvdF\Delta pchA$  ont été cultivées pendant 8 heures en présence de 10  $\mu\text{M}$  de chacun des trois analogues, puis analysées par qRT-PCR (Figure 59).

Nous avons précédemment démontré que la présence de DFOE induit spécifiquement et fortement la transcription de *foxA* dans la souche PAO1, tout en réprimant celle de *fptA*, le gène codant pour le TBDT FptA impliqué dans l'acquisition de la ferri-PCH (Cobessi *et al.*, 2005; Normant *et al.*, 2020). Dans cette étude, les trois analogues FoxE 2-5, FoxE 2-6 et FoxE 3-5 induisent également la transcription de *foxA*, mais uniquement chez la souche incapable de produire la PVD et la PCH ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ) et ce, avec une efficacité inférieure à celle observée pour la DFOE (Figure 59). En parallèle, une répression de *fptA* a été observée pour les trois analogues, bien que cette modulation transcriptionnelle soit moins prononcée que celle induite par la DFOE (Figure 59).



**Figure 59 :** Modulation de la transcription des gènes codant pour des TBDTs impliqués dans l'acquisition du fer chez les cellules de *P. aeruginosa* cultivées en absence ou en présence de DFOE et des analogues du DFOE. Les souches PAO1 et  $\Delta pvdF\Delta pchA$  ont été cultivées en présence ou en absence de 10  $\mu\text{M}$  de NOCA, FoxE 2-5, FoxE 2-6 et FoxE 3-5. La transcription des gènes a été normalisée par rapport à celle des gènes de référence *uvrD* et *rpsL*. Les résultats montrent le rapport entre les valeurs obtenues en présence du chélateur de fer et celles obtenues en son absence. *foxA* code pour le TBDT du DFOE, *fiuA* pour le ferrichrome, *fptA* pour la pyochéline et *fpvA* pour la pyoverdine. Les données représentent la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes.

Ainsi, la transcription de *foxA* est induite non seulement par la présence de la DFOE dans l'environnement bactérien, mais également par ses analogues FoxE 2-5, FoxE 2-6 et FoxE 3-5, ce qui confirme que ces composés utilisent le TBDT FoxA pour entrer dans le périplasme de *P. aeruginosa*. Cette capacité de *P. aeruginosa* à activer l'expression des voies d'acquisition du fer les plus adaptées en fonction de son environnement repose sur sa capacité à détecter la présence de xénosidérophores *via* divers mécanismes de signalisation, impliquant des senseurs et des régulateurs transcriptionnels (Dean *et al.*, 1996; Michel *et al.*, 2005, 2007; Llamas *et al.*, 2008, 2014). En ce qui concerne les sidérophores de type hydroxamate, *foxA* est exprimé en présence de DFOE ou de DFOB (Normant *et al.*, 2020; Perraud, Cantero, *et al.*, 2020). Ces mécanismes de détection reposent sur des systèmes de signalisation impliquant le TBDT couplé aux facteurs sigma/anti-sigma FoxR/FoxI et FiuR/FiuI (Llamas *et al.*, 2006, 2008). Les modifications conformationnelles de protéines et les interactions moléculaires impliquées dans ces cascades de signalisation ont été décrites en détail au cours de l'introduction et notamment dans le cas de la voie d'import du fer par la PVD, dont la régulation implique les facteurs sigma/anti-sigma FpvR/PvdS ou FpvR/FpvI. Selon les connaissances actuelles sur ce système de signalisation, la différence d'efficacité observée dans l'induction de la transcription de *foxA* par les analogues de la DFOE provient très probablement d'une interaction moins favorable de ces molécules avec le site de liaison de FoxA, comparativement au DFOE.

## 2 Xénosidérophores de type hydroxycarboxylate

### 2.1 [Article N°2: Siderophore specificities of the \*Pseudomonas aeruginosa\* TonB-dependent transporters ChtA and ActA](#)

Nous nous sommes également intéressés à l'étude des xénosidérophores de type hydroxycarboxylate, qui représentent l'une des familles de xénosidérophores retrouvés. Lors du commencement de cette étude, la seule référence concernant ces composés remontait à 2006, avec les travaux de l'équipe de Michael O'Connell portant exclusivement sur des sidérophores mixtes alpha-hydroxycarboxylate/hydroxamates et leur capacité à importer le fer chez *P. aeruginosa* (Cuív *et al.*, 2006). Pourtant, ces xénosidérophores représentent un intérêt biologique certain, *P. aeruginosa* pouvant les rencontrer dans divers environnements. Par exemple, la staphyloferrine A (STAPH A) et B, produites par des staphylocoques tels que *S. aureus*, peuvent être présentes lors de co-infection avec *P. aeruginosa* (Madsen *et al.*, 2015). La rhizoferrine (RHIZOF), produite par des Zygomycètes tels que *Mucor lusitanicus*, est quant à elle retrouvée dans la rhizosphère (Alejandre-Castañeda *et al.*, 2022).

Nous avons donc entrepris de caractériser la capacité de *P. aeruginosa* à utiliser deux xénosidérophores de type alpha-hydroxycarboxylate (RHIZOF et STAPH A), ainsi que trois xénosidérophores mixtes alpha-hydroxycarboxylate/hydroxamates : l'aérobactine (AERO), produite par *E. coli* et des souches hypervirulentes de *Klebsiella pneumoniae* ; l'arthrobactine (ARTHRO) produite par *Arthrobacter pascens* ; et la schizokinen (SCHIZO) produite par *Rhizobium* et par *Bacillus megaterium* (Akers, 1983; Johnson *et al.*, 1988; le Roy *et al.*, 1992; Storey *et al.*, 2006).


Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité de *P. aeruginosa* à importer le fer *via* ces xénosidérophores en suivant l'incorporation de <sup>55</sup>Fe au cours du temps. Pour cela, nous avons utilisé une souche incapable de produire ses propres sidérophores ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ), permettant d'observer uniquement l'effet du xénosidérophore testé pour sa capacité à incorporer le fer dans les bactéries au cours du temps. **Ces expériences ont montré que *P. aeruginosa* est capable d'utiliser la RHIZOF, la STAPH A, l'AERO, l'ARTHRO et la SCHIZO pour accéder au fer, bien que l'efficacité soit nettement moindre dans le cas de l'ARTHRO.**

Dans un deuxième temps, à l'instar de l'approche employée pour les xénosidérophores de type hydroxamate, nous avons suivi la croissance de souches  $\Delta pvdF\Delta pchA$ , également délétées pour un ou plusieurs TBDTs d'intérêt, cultivées en condition de carence en fer et en présence d'un excès du xénosidérophore étudié. Cette approche permet d'évaluer l'implication des TBDTs délétés dans l'import des complexes ferri-xénosidérophores chez *P. aeruginosa*.

**Les résultats obtenus montrent que le TBDT PA3268, que nous avons renommé ActA (Alpha-hydroxycarboxylate transporteur A), est impliqué dans l'import des xénosidérophores RHIZOF et STAPH A. Concernant les xénosidérophores mixtes, nous avons confirmé que ChtA est responsable de l'import du fer par l'AERO, tandis que l'ARTHRO et la SCHIZO sont transportés par un autre TBDT, encore non identifié à ce jour. Ces résultats ont été confirmés par le suivi de l'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$  au cours du temps réalisé sur les différents mutants d'intérêt.**

Enfin, des expériences de protéomiques différentielles, complétées par des expériences de qRT-PCR n'ont pas mis en évidence d'induction spécifique de l'expression des gènes *chtA* et *actA* en réponse à la présence des xénosidérophores dans l'environnement bactérien. Ces résultats suggèrent qu'*actA* et *chtA* sont vraisemblablement sous le contrôle exclusif du régulateur transcriptionnel Fur, en réponse à la concentration intracellulaire en fer. Ces travaux ont ainsi permis d'identifier un nouveau transporteur, ActA (PA3268), comme transporteur des xénosidérophores de type carboxylate chez *P. aeruginosa* mais aussi d'élargir notre compréhension sur les mécanismes d'acquisition du fer *via* les xénosidérophores de type hydroxycarboxylate.

## RESEARCH LETTER

**Siderophore specificities of the *Pseudomonas aeruginosa* TonB-dependent transporters ChtA and ActA**Virginie Will<sup>1,2</sup>, Véronique Gasser<sup>1,2</sup>, Lauriane Kuhn<sup>3</sup>, Sarah Fritsch<sup>1,2</sup>, David E. Heinrichs<sup>4</sup> and Isabelle J. Schalk<sup>1,2</sup> 

1 CNRS, University of Strasbourg, UMR7242, ESBS, Strasbourg, France

2 University of Strasbourg, UMR7242, ESBS, Strasbourg, France

3 Plateforme Proteomique Strasbourg – Esplanade, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS FR1589, Strasbourg Cedex, France

4 Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Canada

**Correspondence**I. J. Schalk, CNRS, University of Strasbourg, UMR7242, ESBS, Bld Sébastien Brant, F-67412 Illkirch, Strasbourg, France  
E-mail: [isabelle.schalk@unistra.fr](mailto:isabelle.schalk@unistra.fr)

(Received 27 July 2023, revised 12 September 2023, accepted 13 September 2023)

doi:10.1002/1873-3468.14740

Edited by Seema Mattoo

Iron is an essential nutrient for the survival and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. The pathogen expresses at least 15 different iron-uptake pathways, the majority involving small iron chelators called siderophores. *P. aeruginosa* produces two siderophores, but can also use many produced by other microorganisms. This implies that the bacterium expresses appropriate TonB-dependent transporters (TBDTs) at the outer membrane to import the ferric form of each of the siderophores used. Here, we show that the two  $\alpha$ -carboxylate-type siderophores rhizoferrin-Fe and staphyloferrin A-Fe are transported into *P. aeruginosa* cells by the TBDT ActA. Among the mixed  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate-type siderophores, we found aerobactin-Fe to be transported by ChtA and schizokinen-Fe and arthrobactin-Fe by ChtA and another unidentified TBDT. Our findings enhance the understanding of the adaptability of *P. aeruginosa* and hold significant implications for developing novel strategies to combat antibiotic resistance.

**Keywords:** antibiotic resistance; iron homeostasis; *Pseudomonas aeruginosa*; siderophore; TonB-dependent transporters

Iron is an essential nutrient for the growth and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, a ubiquitous bacterium and opportunistic pathogen often responsible for lung infections. *P. aeruginosa* is able to express and use at least 15 different iron acquisition pathways, each involving a specific set of proteins [1]. Among these import pathways, three involve different haem import strategies [2,3], one uses ferrous iron [4], and a large range use siderophores [1]. Siderophores are small molecules with a molecular mass between 200 and 2000 Da characterized by a very strong affinity

for ferric iron [5]. They show an enormous diversity in their chemical structure, with certain siderophores exclusively possessing catecholate, hydroxamate or  $\alpha$ -hydroxy-carboxylate residues for iron chelation, and many others exhibiting mixtures of different chelating functions [5].

Siderophores are synthesized by bacteria, fungi and plants and secreted into their environment to access iron. For Gram-negative bacteria, once siderophores have scavenged iron, their ferric complexes are transported back into bacteria through the outer membrane

**Abbreviations**

ActA,  $\alpha$ -carboxylate transporter A (gene PA3268); AERO, aerobactin,  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate-type siderophore; ARTHRO, arthrobactin,  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate-type siderophore; CAA, casamino acid, iron-restricted medium; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, proton motive force inhibitor; PCH, pyochelin, *P. aeruginosa* endogenous siderophore; PSM, peptide spectrum matches; PVD, pyoverdine, *P. aeruginosa* endogenous siderophore; RHIZOF, rhizoferrin,  $\alpha$ -carboxylate type siderophore; SCHIZO, schizokinen,  $\alpha$ -carboxylate type siderophore; STAPH A, staphyloferrin A,  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate-type siderophore; TBDT, TonB-dependent transporter.



by TonB-dependent transporters (TBDT) [6]. The uptake activity of TBDTs is dependent on a molecular motor, located in the inner membrane, composed of the three proteins: TonB, ExbB and ExbD [7–10]. The structure of TBDTs is characterized by a  $\beta$  barrel, allowing insertion into the outer membrane, and a globular or plug domain that closes the lumen of the barrel [6]. A binding site is located on the extracellular side of the plug domain and is able to specifically recognize an iron-charged siderophore or a set of ferrisiderophores of very close chemical structure. The TonB-ExbB-ExbD protein complex is activated by the proton gradient through the inner membrane. As a consequence, the TonB protein interacts with the N-terminal periplasmic domain of the TBDTs to allow formation of a channel through the transporter and the import of ferrisiderophore complexes [7–10]. Depending on the pathway, the iron dissociates from the siderophore, either in the periplasm or in the cytoplasm, with transport of the ferrisiderophore complexes through the inner membrane *via* specific transporters in the second case [11].

*Pseudomonas aeruginosa* produces two siderophores, pyoverdine (PVD) and pyochelin (PCH) [12], and can use many siderophores produced by other microorganisms (xenosiderophores) [1]. The ability of *P. aeruginosa* to use siderophores produced by other bacteria is due to the presence of numerous genes encoding TBDTs in its genome, each recognizing and importing a different iron-loaded xenosiderophore or a family of xenosiderophores of similar structure. The xenosiderophores that can be used by *P. aeruginosa* include mycobactins and carboxymycobactins (with FemA as the TBDT, [13]), enterobactin (PfeA and PirA for the TBDTs involved, [14,15]), vibriobactin (FvbA, [16]), nocardamine (FoaA, [17]), ferriochrome and ferrioxamine B (FiuA and FpvB, [18–20]) and even citrate (FecA, [21]). Recently, it has also been demonstrated that monocatechols, such as catecholamine neuro-mediators or plant-derived catechols, can be used as siderophores by *P. aeruginosa*, with PiuA and PirA as the TBDTs involved [22,23].

Here, we investigated the ability of *P. aeruginosa* to use two  $\alpha$ -carboxylate type siderophores, rhizoferrin (RHIZOF) and staphyloferrin A (STAPH A), and revisited the ability to use mixed  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate siderophores, aerobactin (AERO), arthrobactin (ARTHRO), and schizokinen (SCHIZO). RHIZOF is produced by Zygomycetes, such as *Mucor lusitanicus* [24], STAPH A by *Staphylococcus aureus* and many members of the coagulase-negative staphylococci [25], AERO by *E. coli* and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains [26], ARTHRO by *Arthrobacter pascens* ATCC 13346 [27]

and SCHIZO by *Rhizobium* and *Bacillus megaterium* [28,29] (Fig. 1). Previous studies had shown that AERO, SCHIZO and rhizobactin (a siderophore of the same family as RHIZOF) use the TBDT ChtA to import iron into *P. aeruginosa* cells [30]. As we had no access to rhizobactin, we tested here only RHIZOF. Here, using  $^{55}\text{Fe}$  uptake and growth assays, we show that the TBDTs involved are as follows: ActA ( $\alpha$ -carboxylate transporter A, gene PA3268) for RHIZOF and STAPH A, ChtA for AERO, and ChtA and another unidentified TBDT for SCHIZO and ARTHRO.

## Materials and methods

### Chemicals

RHIZOF, AERO, ARTHRO and SCHIZO were purchased from EMC Microcollections (Tübingen, Germany), and STAPH A was synthesized as described previously [31]. The protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA) and  $^{55}\text{FeCl}_3$  was purchased from Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA).

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

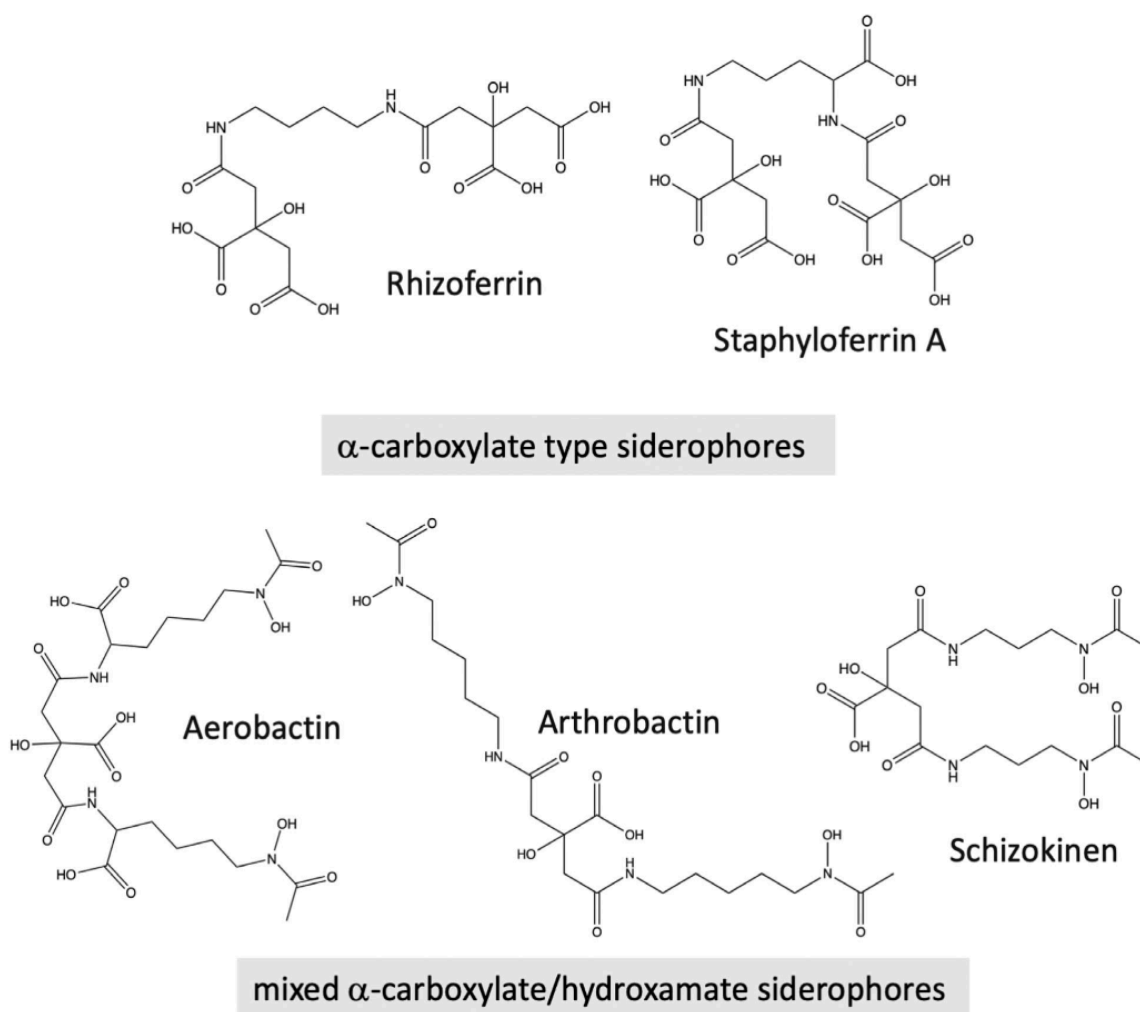
The *P. aeruginosa* strains used in this study are listed in Table S1. The iron-deficient casamino acid (CAA) medium used is composed of 5 g·L<sup>-1</sup> low-iron CAA (Difco, Franklin Lakes, USA), 1.46 g·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O and 0.25 g·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

### Plasmid and strain construction

Enzymes were obtained from Thermo Fisher Scientific. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Massachusetts, USA) was used as the host strain for the plasmids. Plasmid construction and mutagenesis in the chromosomal genome of *P. aeruginosa* were performed as described previously [32]. Briefly, the blunt-end ligation strategy was used to insert 1400 bp of flanking sequences of the genes *chtA* or *actA* into the suicide vector pEXG2. The plasmids were then sequenced and used to introduce chromosomal mutations into the *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain. All generated mutants were verified by PCR and sequencing.

### Iron uptake

Xenosiderophore- $^{55}\text{Fe}$  complexes were prepared at  $^{55}\text{Fe}$  concentrations of 50  $\mu\text{M}$ , with a xenosiderophore : iron (mol : mol) ratio of 20 : 1, as described previously. *P. aeruginosa* strains were successively grown overnight in LB broth, followed by overnight growth in CAA medium and, finally, grown overnight in CAA medium with either



**Fig. 1.** Chemical structure of rhizoferrin, staphyloferrin A, aerobactin, arthrobactin and schizokinen.

10  $\mu\text{M}$  RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO or SCHIZO, all at 30 °C. The bacteria were subsequently used to study  $^{55}\text{Fe}$  uptake kinetics, as described previously, in the presence or absence of 200  $\mu\text{M}$  CCCP (a proton motive force inhibitor) at a concentration of xenosiderophore- $^{55}\text{Fe}$  complexes of 500 nM, with a xenosiderophore : iron (mol : mol) ratio of 20 : 1 [33,34].

#### Growth assays in iron-restricted conditions

For *P. aeruginosa* growth assays in microplates, bacteria were grown as described above: a first overnight culture at 30 °C in 5 mL LB broth, followed by washing of the bacteria and a second overnight culture in 10 mL CAA medium at 30 °C. Bacteria were then washed, resuspended in CAA

medium at an optical density of 0.01 at 600 nm and distributed in the wells of a 96-well plate (Greiner, U-bottom microplate, Frickenhausen, Germany) in the presence or absence of 10  $\mu\text{M}$  RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO or SCHIZO. The plate was incubated at 30 °C, with shaking, in a TECAN microplate reader (Infinite M200, Tecan) and bacterial growth monitored at  $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ . The presented data are the mean of three replicates for each measurement.

#### Proteomic analysis

*Pseudomonas aeruginosa*  $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}$  cells were consecutively grown overnight in LB and then CAA medium. Bacteria were then pelleted and diluted again in CAA medium



at an OD<sub>600 nm</sub> of 0.1 and grown for 8 h with or without 10 μM xenosiderophores at 30 °C. The cells (5 × 10<sup>8</sup>) were harvested and used for proteomic analysis. A biological triplicate was prepared for each sample for each cell-culture condition. Cell pellets were resuspended in 200 μL lysis buffer (UTCT buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS and 20 mM Tris-HCl pH 7.6) supplemented with nuclease and DNase. Protein concentrations were determined with the Bradford assay using bovine serum albumin as the standard. Proteins were further precipitated overnight with glacial 0.1 M ammonium acetate in 100% methanol (five volumes, -20 °C). After centrifugation at 12 000 g and 4 °C for 15 min, the resulting pellets were washed twice with 0.1 M ammonium acetate in 80% methanol and further dried under vacuum (Speed-Vac concentrator, Waltham, Massachusetts, USA). Pellets were resuspended in 100 μL 50 mM ammonium bicarbonate and reduced (5 mM dithiothreitol, 95 °C, 10 min) and alkylated (10 mM iodoacetamide, room temperature, 20 min). Proteins were finally digested overnight with 150 ng sequencing-grade trypsin (Promega, Madison, WI, USA). The proteomic data sets were obtained by injecting 1000 ng of each peptide mixture into a TripleTOF 5600 mass spectrometer (Sciex, Toronto, Canada) coupled to an U3000-RSLC liquid chromatography (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), as described previously. For both differential proteomic analyses, data were searched against the *P. aeruginosa* UniprotKB sub-database (UniprotKB release 2016\_12, taxon 208964, *P. aeruginosa* strain PAO1, 5564 forward protein sequences). Peptides and proteins were identified using the MASCOT algorithm (version 2.5.1; Matrix Science, London, UK). The following parameters were used: (a) Trypsin/P was selected as the enzyme, (b) two missed cleavages were allowed, (c) methionine oxidation and acetylation of the protein N terminus were set as variable modifications and carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification, and (d) mass tolerance for precursor ions was set to 10 ppm and 0.02 Da for fragment ions. Mascot data were further imported into PROLINE v1.4 software [35]. Proteins were validated against a Mascot pretty rank equal to 1 and a 1% FDR for both peptide spectrum matches (PSM score) and protein sets (Protein Set score). All MS/MS fragmentation spectra were used to quantify each protein from at least three independent biological replicates: this 'BasicSC' value, calculated by Proline, included all PSMs of all peptides, including modified peptides (three fixed and variable modifications) and the peptides shared by different protein sets. After column-wise normalization of the data matrix, the 'BasicSC' spectral count values were subjected to a negative-binomial test using edgeR GLM regression of R (R v3.2.5) through the IPInquiry package [36]. The statistical test was based on the published msmsTests R package available in Bioconductor to process label-free LC-MS/MS data by spectral counts [37]. For each identified protein, an

adjusted *P*-value (adj*P*), corrected by the Benjamini-Hochberg procedure, was calculated, as well as the protein fold change (FC). The MS data were deposited in the ProteomeXchange Consortium database via the PRIDE [38] partner repository with the dataset identifier PXD043056 and 10.6019/PXD043056.

### Quantitative real-time PCR

The expression of specific genes of interest was monitored by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) as described previously [32,39]. After a first overnight incubation in LB medium, *ΔpvdFΔpchA* cells were grown in 10 mL CAA medium. Bacteria were then washed, resuspended in CAA medium at an optical density of 0.1 at 600 nm and incubated in the presence of 10 or 100 μM RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO or SCHIZO, with shaking (220 rpm), at 30 °C. After 8 h of incubation, 2.5 × 10<sup>8</sup> cells were collected from the cultures and two volumes of RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) were added. Total RNA was extracted from the pellet using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Total RNA (1 μg) was reverse transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad). Specific cDNA in our samples was quantified using a CFX Opus 96 (Biorad), the appropriate primers (Table S3) and iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, California, USA). The transcript level for each gene was normalized against those of *uvrD* and *rpsL* and are expressed as a log<sub>2</sub> ratio (fold change) relative to the reference condition.

## Results and Discussion

### RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO and SCHIZO transport <sup>55</sup>Fe into *P. aeruginosa* cells

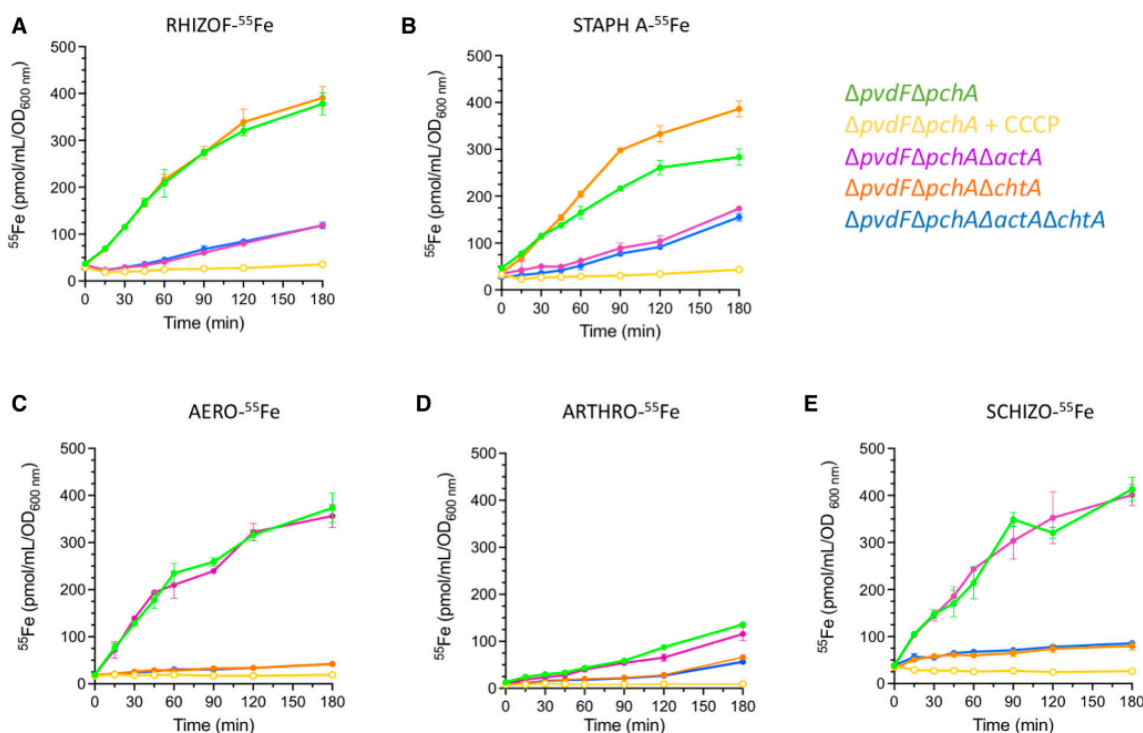
We investigated the ability of AERO, ARTHRO, SCHIZO, RHIZOF and STAPH A to be used as xenosiderophores by *P. aeruginosa* and compared their efficiency of iron uptake by using <sup>55</sup>Fe. *P. aeruginosa* *ΔpvdFΔpchA* (Table S1), a strain unable to produce the siderophores PVD and PCH, was grown under iron-starvation conditions and in the presence of 10 μM of the apo form (without iron) of one of the xenosiderophores to induce expression of the corresponding iron-uptake pathway. Indeed, previous studies have shown that *P. aeruginosa* is able to detect the presence of certain xenosiderophores in its environment and induce expression of the proteins belonging to the corresponding iron-uptake pathway in response [13,18,32,39-42]. The *ΔpvdFΔpchA* mutant was used to avoid any iron uptake by the siderophores PVD and PCH produced by *P. aeruginosa*. *ΔpvdFΔpchA* cells

were then incubated in the presence of one of the five xenosiderophores in complex with  $^{55}\text{Fe}$  and the radioactivity incorporated into the bacteria followed as a function of time. We observed  $^{55}\text{Fe}$  accumulation for RHIZOF, STAPH A, AERO and SCHIZO, with very similar uptake rates of  $\sim 280\text{--}400\text{ pmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{OD}_{600\text{ nm}}^{-1}$  after a 3-h incubation (Fig. 2A–C, E, kinetics in green). This is within the range that has been previously reported for PVD and PCH [32,43,44]. The  $^{55}\text{Fe}$  uptake rates for ARTHRO were clearly less efficient (Fig. 2D, kinetic in green).  $^{55}\text{Fe}$  accumulation was no longer observed for  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells preincubated with the protonophore CCCP for all five xenosiderophores (kinetics in yellow), demonstrating that the iron uptake observed for these compounds is dependent on the bacterial proton motive force. Therefore, the observed  $^{55}\text{Fe}$  uptake was not due to passive diffusion across the outer membrane *via* porins or nonspecific association with the cell surface, but rather to

transport carried out by TBDTs. In conclusion, the five xenosiderophores, RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO and SCHIZO, can transport iron into *P. aeruginosa* cells and act as xenosiderophores, but this uptake is clearly less efficient for ARTHRO.

### None of these xenosiderophores significantly induces the transcription or expression of a TBDT

Previous studies have shown that the presence of certain xenosiderophores, such as enterobactin, nocardamine or ferrichrome, in the environment of *P. aeruginosa* induces the expression of the corresponding TBDT by mechanisms involving sigma/anti-sigma factors, two-component systems or AraC-type transcriptional regulators [32,42]. Such induction of expression of the TBDT corresponding by its xenosiderophore often goes hand in hand with repression of the expression of the



**Fig. 2.**  $^{55}\text{Fe}$  uptake by *P. aeruginosa* strains mediated by RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO and SCHIZO. *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells were grown in iron-restricted CAA medium in the presence of  $10\ \mu\text{M}$  RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO or SCHIZO, to induce expression of the corresponding uptake pathway. Afterwards, bacteria were incubated with  $500\ \text{nM}$  RHIZOF- $^{55}\text{Fe}$ , STAPH A- $^{55}\text{Fe}$ , AERO- $^{55}\text{Fe}$ , ARTHRO- $^{55}\text{Fe}$  or SCHIZO- $^{55}\text{Fe}$ . The amount of  $^{55}\text{Fe}$  taken up by the bacteria was measured as a function of time. As a control, the experiment was repeated in the presence of the protonophore CCCP ( $200\ \mu\text{M}$ ). The experiment was repeated with the corresponding  $\Delta chtA$  and  $\Delta actA$  deletion mutants of  $\Delta pvdF\Delta pchA$ . Error bars indicate standard deviation and were calculated from three independent biological replicates.

genes involved in the uptake of iron by PCH, whereas no effect is generally seen for the genes involved in iron uptake by PVD [17,32,39,42,43].

Proteomic analyses of *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  grown in the presence or absence of 10  $\mu\text{M}$  of RHIZOF, STAPH A, AERO and SCHIZO, showed the induction of *chtA* and *actA* (PA3268) expression, with fold changes between 1.87 and 5.2, but with poor statistics suggesting that the expression induction observed may be an artefact (Fig. S1, ARTHRO was not tested since the  $^{55}\text{Fe}$  uptake was low). Indeed, such induction of *chtA* and *actA* expression was not confirmed at the transcriptional level by qRT-PCR (Fig. S2). For the qRT-PCR assay, we tested two concentrations of xenosiderophores, 10 and 100  $\mu\text{M}$ , expecting that the transcription of *chtA* and/or *actA* could be induced by the higher concentration of xenosiderophores. The effect of ARTHRO on *chtA* and/or *actA* transcription was also tested in qRT-PCR. We observed no induction of the transcription of these two genes, even at 100  $\mu\text{M}$  for all five xenosiderophores indicating these xenosiderophores are not able to induce the transcription and expression of *chtA* or *actA* when present in the environment of *P. aeruginosa*. ChtA has been previously reported to be involved in the uptake of iron via AERO, SCHIZO and rhizobactin [30]. ActA is encoded by the gene PA3268, but the ligand transported by this transporter has not yet been identified. Surprisingly, *oprC* expression was repressed in the presence of 10  $\mu\text{M}$  RHIZOF, SCHIZO or STAPH A, with fold changes between  $-5.6$  and  $-2.5$  relative to cells grown in the absence of any xenosiderophore (Fig. S1). OprC is a TBDT involved in copper acquisition [45]. Such a reduction in *oprC* expression could not be confirmed at the transcriptional level by qRT-PCR (Fig. S2), raising doubts about its biological significance and the possibility that these xenosiderophores may import copper.

In conclusion, the proteomic and qRT-PCR data were not consistent concerning the induction of transcription and expression of *chtA* and *actA* by RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO or SCHIZO, making it difficult to draw any definitive conclusions. If expression of one of these TBDTs is induced by one of the xenosiderophores tested, it may be at a low level that is not easily detected by the approaches used here.

#### ActA imports iron via RHIZOF and STAPH A, the two $\alpha$ -carboxylate type xenosiderophores

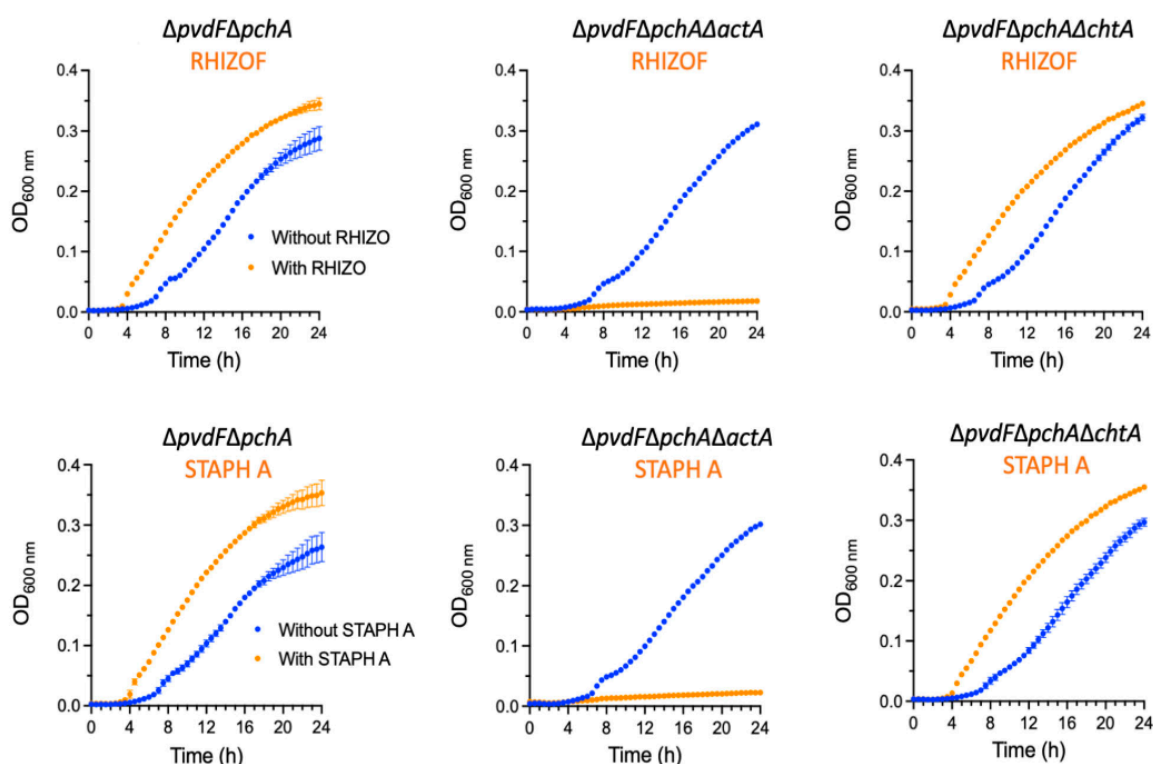
We further investigated the uptake pathway used by RHIZOF and STAPH A to import iron using a growth assay described previously [44] with the  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain grown under iron-restricted

conditions (CAA medium containing  $\sim 20$  nM iron, [46]). In this growth condition, the *P. aeruginosa* strain is unable to produce PVD and PCH and probably accesses iron via citrate or imports ferrous iron after reduction. The addition of 10  $\mu\text{M}$  RHIZOF or STAPH A to this medium stimulated growth for both xenosiderophores tested, confirming that they can promote  $\Delta pvdF\Delta pchA$  growth by importing iron into the bacteria (Fig. 3). In this assay, the presence of a xenosiderophore unable to import iron into *P. aeruginosa* cells completely inhibited growth, as previously shown for bacillibactin [44].

We used both the growth and  $^{55}\text{Fe}$  uptake assays to try to identify the TBDTs involved in the uptake of iron by these xenosiderophores. If a TBDT is involved, deletion of its gene should affect the growth of the bacteria, because no more iron uptake occurs. In the presence of RHIZOF and STAPH A, complete growth inhibition was observed when *actA* (PA3268) was deleted, clearly showing that ActA is the only TBDT that imports iron via these two xenosiderophores (Fig. 3). Mutation of *chtA* had no effect on growth in the presence of RHIZOF, indicating that, unlike rhizobactin [30], ChtA is not involved in iron acquisition by RHIZOF. Concerning the  $^{55}\text{Fe}$  assay, surprisingly, mutation of *actA* did not completely abolish  $^{55}\text{Fe}$  uptake for either the RHIZOF- $^{55}\text{Fe}$  or STAPH A- $^{55}\text{Fe}$  complexes (69% and 39% inhibition, respectively, Fig. 2), contrary to what would have been expected from the results of the growth experiments, and mutation of *chtA* had no effect on  $^{55}\text{Fe}$  import. The remaining  $^{55}\text{Fe}$  uptake observed for the  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta actA$  strain likely corresponds to the uptake of RHIZOF- $^{55}\text{Fe}$  and STAPH A- $^{55}\text{Fe}$  via another pathway involving an unidentified TBDT. However, iron taken up via this uptake pathway appears to not be bioavailable for *P. aeruginosa*, as deletion of *actA* alone completely abolished growth in iron-restricted medium (Fig. 3). One explanation could be that iron cannot be removed from RHIZOF and STAPH A in this second unidentified uptake pathway because it is unable to interact with the enzyme(s) involved in this process. Another possibility is that  $^{55}\text{Fe}$  in this second uptake pathway is blocked in the periplasm and unable to reach the cytoplasm because the two xenosiderophore- $^{55}\text{Fe}$  complexes are unable to be transported across the inner membrane.

Overall, these data show that ActA is the TBDT of the  $\alpha$ -carboxylate type siderophores RHIZOF and STAPH A. Another TBDT is apparently also able to import the two RHIZOF- $^{55}\text{Fe}$  and STAPH A- $^{55}\text{Fe}$  complexes across the outer membrane, but the iron is not bioavailable for *P. aeruginosa* cells. Contrary to what has been reported previously for rhizobactin [30],





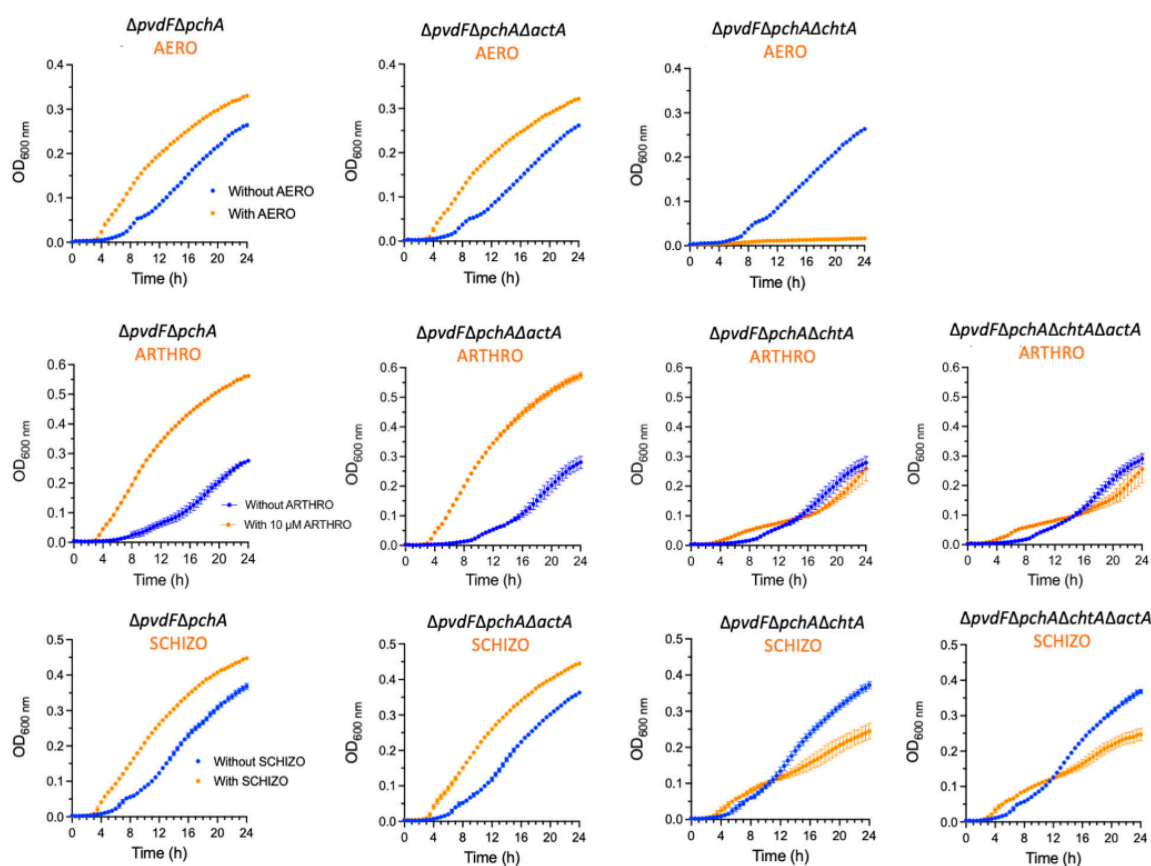
**Fig. 3.** Growth of  $\Delta pvdF\Delta pchA$  *P. aeruginosa* mutants in the presence of RHIZOF or STAPH A.  $\Delta pvdF\Delta pchA$  and its corresponding  $\Delta chtA$  and  $\Delta actA$  deletion mutants were grown in CAA medium in the presence (growth kinetics in orange) or absence (kinetics in blue) of 10  $\mu\text{M}$  RHIZOF or STAPH A. Growth was followed by monitoring the optical density at 600 nm. Error bars indicate standard deviation and were calculated from three independent biological replicates.

ChtA is not involved in iron acquisition by RHIZOF, which is surprising since both xenosiderophores have close chemical structures. It would be interesting to revisit the ability of ChtA to import iron *via* rhizobactin (unfortunately we were unable to get purified rhizobactin).

#### **ChtA is the TBDT involved in the uptake of iron by AERO, ARTHRO and SCHIZO, the three mixed $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate-type xenosiderophores**

Using the same strategy as described above, we observed complete inhibition of bacterial growth in the presence of AERO when the *chtA* gene was deleted, indicating that ferri-AERO is transported into *P. aeruginosa* cells exclusively by this TBDT (Fig. 4). In the presence of ARTHRO or SCHIZO, the growth of  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta chtA$  was only partially (54% and 45% respectively) affected by deletion of *chtA* compared with the growth of  $\Delta pvdF\Delta pchA$ . Deletion of *actA* had

no additional inhibitory effect on the growth of the  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta chtA\Delta actA$  mutant. As complete inhibition of growth was not observed with deletion of either *chtA* or *actA*, at least one other unidentified TBDT is involved in the uptake of iron by ARTHRO and SCHIZO. Concerning the  $^{55}\text{Fe}$  assay, the deletion of *chtA* completely abolished the import of iron by AERO, perfectly consistent with the results observed in the growth experiment, confirming that ChtA is the only TBDT involved in iron import by this xenosiderophore. For ARTHRO and SCHIZO, the deletion of *actA* had no effect on  $^{55}\text{Fe}$  uptake, and the deletion of *chtA* abolished 51% and 81% of  $^{55}\text{Fe}$  uptake respectively, a greater impact than that observed on bacterial growth. One explanation could be that the second unidentified TBDT involved is less efficient in importing iron but still allows the bacteria to survive in an iron-restricted environment. Such lower efficiency could come from lower expression of the TBDT involved or lower affinity of the Ferri-ARTHRO and ferri-SCHIZO complexes for the binding site of this TBDT.



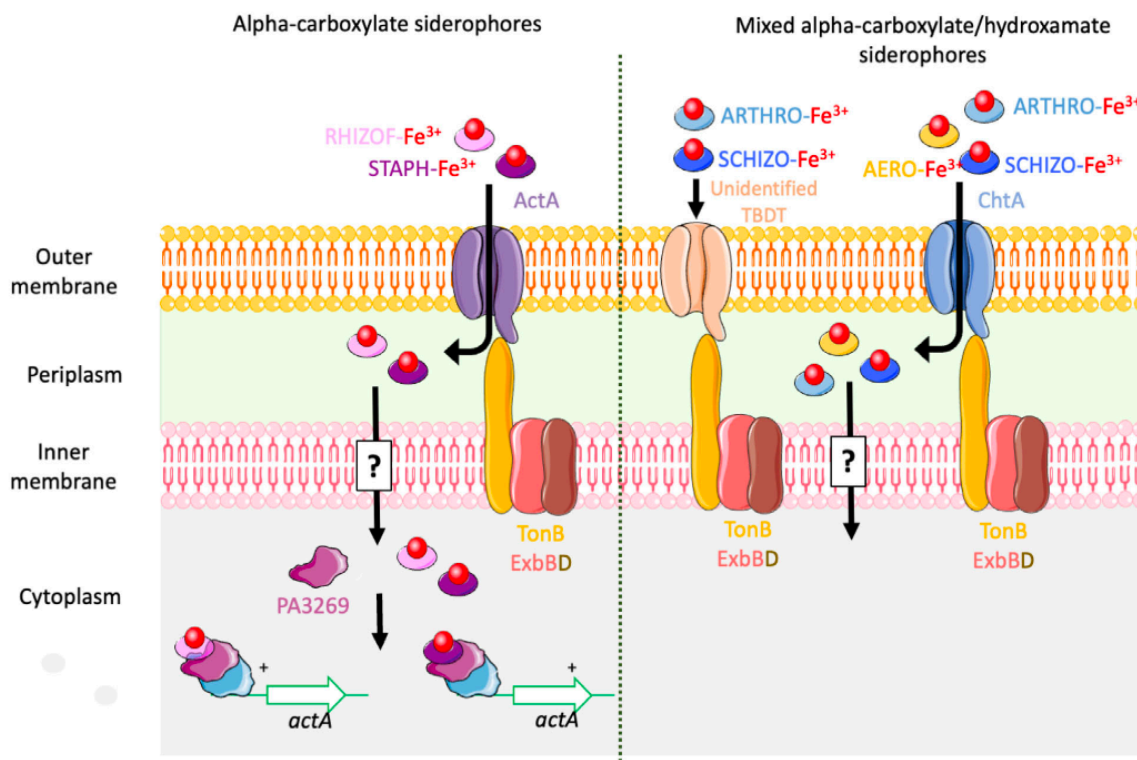
**Fig. 4.** Growth of  $\Delta pvdF\Delta pchA$  *P. aeruginosa* mutants in the presence of AERO, ARTHRO or SCHIZO. The PVD and PCH-deficient strain of *P. aeruginosa* ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ) and its corresponding  $\Delta actA$  and  $\Delta chtA$  deletion mutants were used. Strains were grown in CAA medium in the presence (growth kinetics in orange) or absence (kinetics in blue) of 10  $\mu M$  AERO, ARTHRO or SCHIZO. Growth was followed by monitoring the optical density at 600 nm. Error bars indicate standard deviation and were calculated from three independent biological replicates.

Overall, these data show that ChtA transports the ferri forms of the mixed  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate siderophores AERO, ARTHRO and SCHIZO, confirming previous studies [30]. However, according to our data, another unidentified transporter is also involved in ferri-ARTHRO and ferri-SCHIZO transport.

## Conclusion

Here, we show that *P. aeruginosa* can use RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO and SCHIZO as siderophores, expanding the number of xenosiderophores used by this pathogen. RHIZOF, STAPH A, AERO and SCHIZO transport  $^{55}Fe$  with an efficiency close to that previously reported for PVD, PCH, enterobactin, ferrichrome and nocardamine [17,32].  $^{55}Fe$  uptake by ARTHRO was less efficient. The fact that this bacterium can use many xenosiderophores is an advantage

for its survival in various microbial communities. For example, *S. aureus* and *P. aeruginosa* are frequently co-isolated from chronic infection, including the pulmonary infections of persons with cystic fibrosis (CF) and chronic wounds [47–51]. The ability of *P. aeruginosa* to use STAPH A to access iron may play a key role in such co-infections. Recent studies have also shown that *S. aureus* inactivates *P. aeruginosa* siderophore PCH via methylation, indicating as well that competition for iron must be a tough battle between both pathogens in co-infections [52]. The two  $\alpha$ -carboxylate type xenosiderophores, RHIZOF-Fe and STAPH A-Fe, are transported into *P. aeruginosa* cells by ActA (*PA3268*), a TBDT for which the transported molecule had not been identified to date (Scheme 1). The gene *PA3269*, encoding an AraC-type transcriptional regulator, is localized next to the *actA* gene, suggesting that *actA* transcription should involve a



**Scheme 1.** Iron acquisition by the xenosiderophores RHIZOF, STAPH A, AERO, ARTHRO and SCHIZO, in *P. aeruginosa*. For more details, see the text.

molecular mechanism similar to that of *fptA* (ferripyochelin TBDT). Indeed, PchR is an AraC transcriptional regulator capable of bind ferripyochelin transported into the bacteria by FptA, and inducing the transcription of *fptA* [41,53,54]. According to the transcriptomic and proteomic data presented above, RHIZOF and STAPH A appear to be unable to efficiently induce *actA* transcription and expression.

For the mixed  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate-type xenosiderophores, AERO-Fe is transported by ChtA (as previously described [30]) and ARTHRO-Fe and SCHIZO-Fe, by ChtA and another unidentified TBDT (Scheme 1). These two TBDTs, ActA and ChtA, have different binding selectivity: ActA is specific for  $\alpha$ -carboxylate type siderophores and ChtA for mixed  $\alpha$ -carboxylate/hydroxamate siderophores.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for general financial support. The presented work was also 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). The mass spectrometry instrumentation at the IBMC was funded by the University of Strasbourg, IdEx 'Equipement mi-lourd' 2015. VW had a fellowship from the Ministry of Research and Education. Work in the Heinrichs laboratory was funded by the Canadian Institutes of Health Research grant PJT-183848.

## Author contributions

VW carried out all the <sup>55</sup>Fe uptake assays, qRT-PCR and bacterial growth assays, and prepared the figures of the manuscript. LK carried out the proteomic experiments and analyses, writing—review and editing. SF generated the mutants used in the manuscript. DEH provided the staphyloferrin. VG contributed to the conceptualization and supervised the biological experiments. IJS contributed to the conceptualization, supervised the biological experiments, writing—review



and editing, funding acquisition and project administration. All authors reviewed the manuscript.

## Peer review

The peer review history for this article is available at <https://www.webofscience.com/api/gateway/wos/peer-review/10.1002/1873-3468.14740>.

## Data accessibility

The MS data that support the findings of this study are openly available in ProteomeXchange Consortium database at <http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD043056> (FTP Download: <ftp://ftp.pride.ebi.ac.uk/pride/data/archive/2023/09/PXD043056>), reference number PXD043056.

## References

- Schalk IJ and Perraud Q (2023) *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environ Microbiol* **25**, 811–831.
- Smith AD and 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.
- Otero-Asman JR, García-García AI, Civantos C, Quesada JM and Llamas MA (2019) *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem. *Environ Microbiol* **21**, 4629–4647.
- Lau CKY, Krewulak KD and Vogel HJ (2016) Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev* **40**, 273–298.
- Hider RC and Kong X (2011) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* **27**, 637–657.
- Schalk IJ, Mislin GLA and Brillet K (2012) Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters. *Curr Top Membr* **69**, 37–66.
- Celia H, Noinaj N, Zakharov SD, Bordignon E, Botos I, Santamaria M, Barnard TJ, Cramer WA, Lloubes R and Buchanan SK (2016) Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature* **538**, 60–65.
- Celia H, Botos I, Ni X, Fox T, De Val N, Lloubes R, Jiang J and Buchanan SK (2019) Cryo-EM structure of the bacterial Ton motor subcomplex ExbB-ExbD provides information on structure and stoichiometry. *Commun Biol* **2**, 358.
- Celia H, Noinaj N and Buchanan SK (2020) Structure and stoichiometry of the Ton molecular motor. *Int J Mol Sci* **21**, 375.
- Ratliff AC, Buchanan SK and Celia H (2021) Ton motor complexes. *Curr Opin Struct Biol* **67**, 95–100.
- Schalk IJ and 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.
- Schalk IJ, Rigouin C and Godet J (2020) An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent Pseudomonads and new insights into their complex cellular organization. *Environ Microbiol* **22**, 1447–1466.
- Llamas MA, Mooij MJ, Sparrius M, Vandenbroucke-Grauls CM, Ratledge C and Bitter W (2008) Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol* **67**, 458–472.
- Ghysels B, Ochsner U, Mollman U, Heinisch L, Vasil M, Cornelis P and Matthijs S (2005) The *Pseudomonas aeruginosa* *pirA* gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. *FEMS Microbiol Lett* **246**, 167–174.
- Moynié L, Milenkovic S, Mislin GLA, Gasser V, Mallocci G, Baco E, McCaughan RP, Page MGP, Schalk IJ, Ceccarelli M et al. (2019) The complex of ferric-enterobactin with its transporter from *Pseudomonas aeruginosa* suggests a two-site model. *Nat Commun* **10**, 3673.
- Elias S, Degtyar E and Banin E (2011) FvbA is required for vibriobactin utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **157**, 2172–2180.
- Normant V, Josts I, Kuhn L, Perraud Q, Fritsch S, Hammann P, Mislin GLA, Tidow H and Schalk IJ (2020) Nocardamine-dependent iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: exclusive involvement of the FoxA outer membrane transporter. *ACS Chem Biol* **15**, 2741–2751.
- Llamas MA, Sparrius M, Kloet R, Jimenez CR, Vandenbroucke-Grauls C and Bitter W (2006) The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 1882–1891.
- Hannauer M, Barda Y, Mislin GL, Shanzer A and Schalk IJ (2010) The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome. *J Bacteriol* **192**, 1212–1220.
- Chan DCK and Burrows LL (2023) *Pseudomonas aeruginosa* FpvB is a high-affinity transporter for xenosiderophores ferrichrome and ferrioxamine B. *mBio* **14**, e0314922.
- Marshall B, Stintzi A, Gilmour C, Meyer J-M and Poole K (2009) Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-

- inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology* **155**, 305–315.
- 22 Perraud Q, Kuhn L, Fritsch S, Graulier G, Gasser V, Normant V, Hammann P and Schalk IJ (2022) Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **24**, 878–893.
- 23 Luscher A, Gasser V, Bumann D, Mislin GLA, Schalk IJ and Köhler T (2022) Plant-derived catechols are substrates of TonB-dependent transporters and sensitize *Pseudomonas aeruginosa* to siderophore-drug conjugates. *MBio* **13**, e0149822.
- 24 Alejandre-Castañeda V, Patiño-Medina JA, Valle-Maldonado MI, Nuñez-Anita RE, Santoyo G, Castro-Cerritos KV, Ortiz-Alvarado R, Corrales-Escobosa AR, Ramírez-Díaz MI, Gutiérrez-Corona JF *et al.* (2022) Secretion of the siderophore rhizoferrin is regulated by the cAMP-PKA pathway and is involved in the virulence of *Mucor lusitanicus*. *Sci Rep* **12**, 10649.
- 25 Madsen JLH, Johnstone TC and Nolan EM (2015) Chemical synthesis of Staphyloferrin B affords insight into the molecular structure, iron chelation, and biological activity of a polycarboxylate siderophore deployed by the human pathogen *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc* **137**, 9117–9127.
- 26 Johnson JR, Moseley SL, Roberts PL and Stamm WE (1988) Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infect Immun* **56**, 405–412.
- 27 le Roy D, Expert D, Razafindratsita A, Deroussent A, Cosme J, Bohuon C and Andremont A (1992) Activity and specificity of a mouse monoclonal antibody to ferric aerobactin. *Infect Immun* **60**, 768–772.
- 28 Akers HA (1983) Isolation of the siderophore schizokinen from soil of rice fields. *Appl Environ Microbiol* **45**, 1704–1706.
- 29 Storey EP, Boghzoian R, Little JL, Lowman DW and Chakraborty R (2006) Characterization of “Schizokinen”; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *Biomaterials* **19**, 637–649.
- 30 Cuiv PO, Clarke P and O’Connell M (2006) Identification and characterization of an iron-regulated gene, *chtA*, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **152**, 945–954.
- 31 Cooper JD, Hannauer M, Marolda CL, Briere L-AK and Heinrichs DE (2014) Identification of a positively charged platform in *Staphylococcus aureus* HtsA that is essential for ferric staphyloferrin A transport. *Biochemistry* **53**, 5060–5069.
- 32 Perraud Q, Cantero P, Roche B, Gasser V, Normant VP, Kuhn L, Hammann P, Mislin GLA, Ehret-Sabatier L and Schalk IJ (2020) Phenotypic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* by hacking siderophores produced by other microorganisms. *Mol Cell Proteomics* **19**, 589–607.
- 33 Hoegy F, Lee X, Noël S, Mislin GL, Rognan D, Reimmann C and Schalk IJ (2009) Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent Pseudomonads. *J Biol Chem* **284**, 14949–14957.
- 34 Hoegy F and Schalk IJ (2014) Monitoring iron uptake by siderophores. *Methods Mol Biol* **1149**, 337–346.
- 35 Bouyssié D, Hesse A-M, Mouton-Barbosa E, Rompais M, Macron C, Carapito C, Gonzalez de Peredo A, Couté Y, Dupierris V, Burel A *et al.* (2020) Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **36**, 3148–3155.
- 36 Kuhn L, Vincent T, Hammann P and Zuber H (2023) Exploring protein interactome data with IPInquiry: statistical analysis and data visualization by spectral counts. *Methods Mol Biol* **2426**, 243–265.
- 37 Gregori J, Sanchez A and Villanueva J (2019) msmsTests: LC-MS/MS differential expression tests.
- 38 Vizcaíno JA, Csordas A, del Toro N, Dienes JA, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T *et al.* (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res* **44**, D447–D456.
- 39 Gasser V, Baco E, Cunrath O, August PS, Perraud Q, Zill N, Schleberger C, Schmidt A, Paulen A, Bumann D *et al.* (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.
- 40 Dean CR, Neshat S and Poole K (1996) PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**, 5361–5369.
- 41 Michel L, Gonzalez N, Jagdeep S, Nguyen-Ngoc T and Reimmann 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.
- 42 Perraud Q, Cantero P, Munier M, Hoegy F, Zill N, Gasser V, Mislin GLA, Ehret-Sabatier L and Schalk IJ (2020) Phenotypic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of siderophore-antibiotic conjugates during epithelial cell infection. *Microorganisms* **8**, 1820.
- 43 Normant V, Kuhn L, Munier M, Hammann P, Mislin GLA and Schalk IJ (2021) How the presence of hemin affects the expression of the different iron uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa* cells. *ACS Infect Dis* **15**, 2741–2751.



- 44 Fritsch S, Gasser V, Peukert C, Pinkert L, Kuhn L, Perraud Q, Normant V, Brönstrup M and Schalk IJ (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.
- 45 Cornelis P and Bodilis J (2009) A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent *Pseudomonads*. *Environ Microbiol Rep* **1**, 256–262.
- 46 Cunrath O, Geoffroy VA and Schalk IJ (2016) Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. *Environ Microbiol* **18**, 3258–3267.
- 47 Hubert D, Réglie-Poupet H, Sermet-Gaudelus I, Ferroni A, Bourgeois ML, Burgel P-R, Serreau R, Dusser D, Poyart C and Coste J (2013) Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **12**, 497–503.
- 48 Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M and Cellini L (2015) Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *Int Wound J* **12**, 47–52.
- 49 Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A and Franco OL (2017) Bacterial contribution in chronicity of wounds. *Microb Ecol* **73**, 710–721.
- 50 Ibberson CB and Whiteley M (2020) The social life of microbes in chronic infection. *Curr Opin Microbiol* **53**, 44–50.
- 51 Yung DBY, Sircombe KJ and Pletzer D (2021) Friends or enemies? The complicated relationship between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **116**, 1–15.
- 52 Jenul C, Keim KC, Jens JN, Zeiler MJ, Schilcher K, Schurr MJ, Melander C, Phelan VV and Horswill AR (2023) Pyochelin biotransformation by *Staphylococcus aureus* shapes bacterial competition with *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial infections. *Cell Rep* **42**, 112540.
- 53 Michel L, Bachelard A and Reimann C (2007) Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**, 1508–1518.
- 54 Cunrath O, Graulier G, Carballido-Lopez A, Pérard J, Forster A, Geoffroy VA, Saint Auguste P, Bumann D, Mislin GLA, Michaud-Soret I et al. (2020) The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* optimizes the production of the siderophore pyochelin upon environmental challenges. *Metallomics* **12**, 2108–2120.

## Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

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

**Table S2.** Primers used for the construction of the  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta chtA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta actA$  and  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta actA\Delta chtA$  strains.

**Table S3.** Primers used in this study for RT-qPCR.

**Table S4.** TBDTs present in the *P. aeruginosa* PAO1 genome.

**Figure S1.** A. Differential proteomic analyses of *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  grown in the presence of 10  $\mu\text{M}$  SCHIZO, STAPH A, AERO or RHIZOF.

**Figure S2.** Quantitative real-time PCR on *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  grown in the presence or absence of SCHIZO, STAPH A, AERO, ARTHRO or RHIZOF.

# MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

## Siderophore specificities of the *Pseudomonas aeruginosa* TonB-dependent transporters ChtA and ActA

Virginie Will<sup>1,2</sup>, Véronique Gasser<sup>1,2</sup>, Lauriane Kuhn<sup>3</sup>, Sarah Fritsch<sup>1,2</sup>, David E. Heinrichs<sup>4</sup> and Isabelle J. Schalk<sup>1,2\*</sup>.

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

Strains and plasmids	Collection ID	Relevant characteristics	Reference
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>			
$\Delta pvdF\Delta pchA$	PAS283	PAO1; <i>pvdF</i> and <i>pchA</i> chromosomally deleted	[1]
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta chtA$	PAS653	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> and <i>chtA</i> chromosomally deleted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta actA$	PAS635	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , and <i>actA</i> chromosomally deleted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta actA\Delta chtA$	PAS655	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , <i>actA</i> and <i>chtA</i> chromosomally deleted	This study
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
TOP10		F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> $\lambda$ -	Invitrogen
<b>Plasmids</b>			
pEXG2	pEXG2	allelic exchange vector with pBR origin, gentamicin resistance, <i>sacB</i>	[2]
pEXG2 $\Delta chtA$	pSF07	pEXG2 carrying the sequence to delete <i>chtA</i>	This study
pEXG2 $\Delta actA$	pSF03	pEXG2 carrying the sequence to delete PA3268 ( <i>actA</i> )	This study

**Table S2. Primers used for the construction of the  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta chtA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta actA$ , and  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta actA\Delta chtA$  strains. *actA* = gene PA3268.**

Oligonucleotides	Gene	Sequence
PA3268stop-550HindIII-F	<i>actA</i>	AAAAAAGCTTGGATCGAATACTTCACCGGGC
PA3268stop+117overlap-R	<i>actA</i>	GCACGGTCACCGTGGTCGCGTCGAACCTGAAGCTCGGA
PA3268start-97-F	<i>actA</i>	CGACCACGGTGACCGTGC
PA3268start-546XbaI-R	<i>actA</i>	AAAATCTAGACGTCCACTTGCACCGCCTG
PA4675Start-784 pb EcoRI	<i>chtA</i>	AAAAGAATTCAGTAACGCCCCAGACGAATCG
PA4675Start + 18 pb overlap	<i>chtA</i>	CAGGCTGTAGGTCCGCCCCAGGGGAGCCGGGCG
PA4675Stop + 714 pb HindIII	<i>chtA</i>	AAAAAAGCTTTCAAACGAGGGGCATGCCATG
PA4675Stop -18 pb	<i>chtA</i>	GGGCGGACCTACAGCCTG

**Table S3. Primers used in this study for RT-qPCR.**

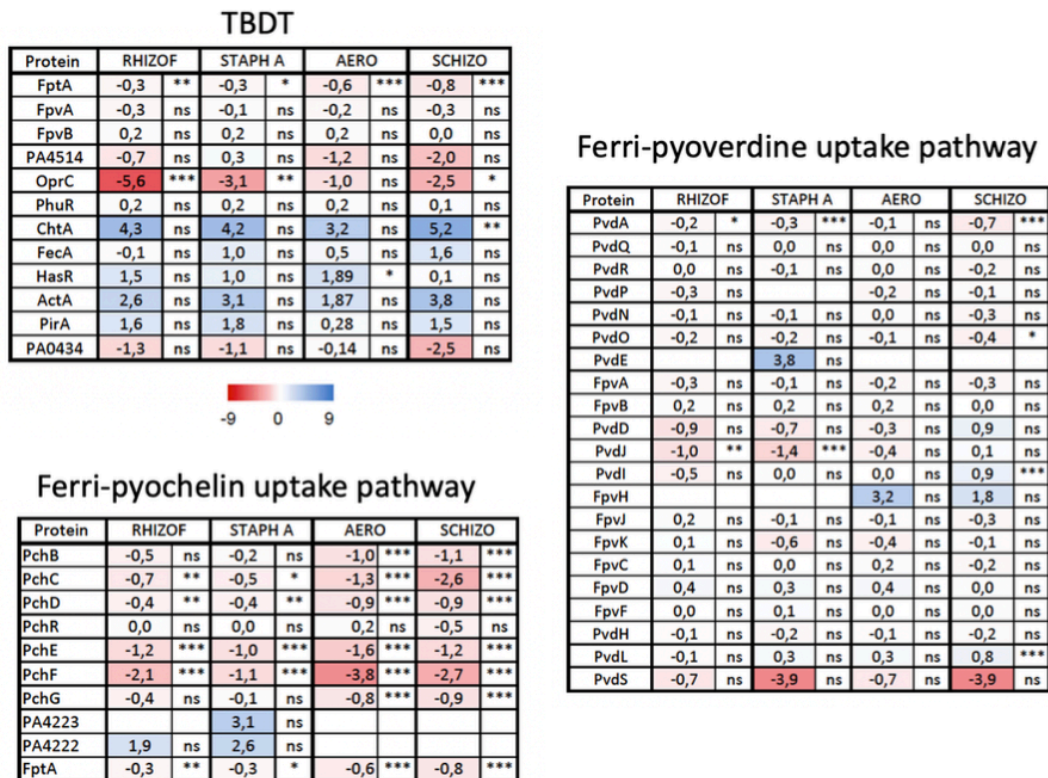
---

<b>Oligonucleotides</b>	<b>Sequence (5' to 3')</b>
<i>uvrD</i> F	CTACGGTAGCGAGACCTACAACAA
<i>uvrD</i> R	GCGGCTGACGGTATTGGA
<i>rpsL</i> F	TACACCACCACGCCGAAAA
<i>rpsL</i> R	CACCACCGATGTACGAGGAA
<i>fpvA</i> F	AGCCGCCTACCAGGATAAGC
<i>fpvA</i> R	TGCCGTAATAGACGCTGGTTT
<i>fptA</i> F	GCGCCTGGGCTACAAGATC
<i>fptA</i> R	CCGTAGCGGTTGTTCCAGTT
<i>oprC</i> F	GGACGGCTCGCAGTTCAA
<i>oprC</i> R	AGACCTGTGCCTCGACCTTCT
<i>chtA</i> F	AACGAGAAGATGGCCTTCAATC
<i>chtA</i> R	TCTTACCAGGGCCAGTTTC
<i>actA</i> F	CGTGCTGCTCAAGACCCATT
<i>actA</i> R	CGTAGGCGTCGTAGTAGTGAA

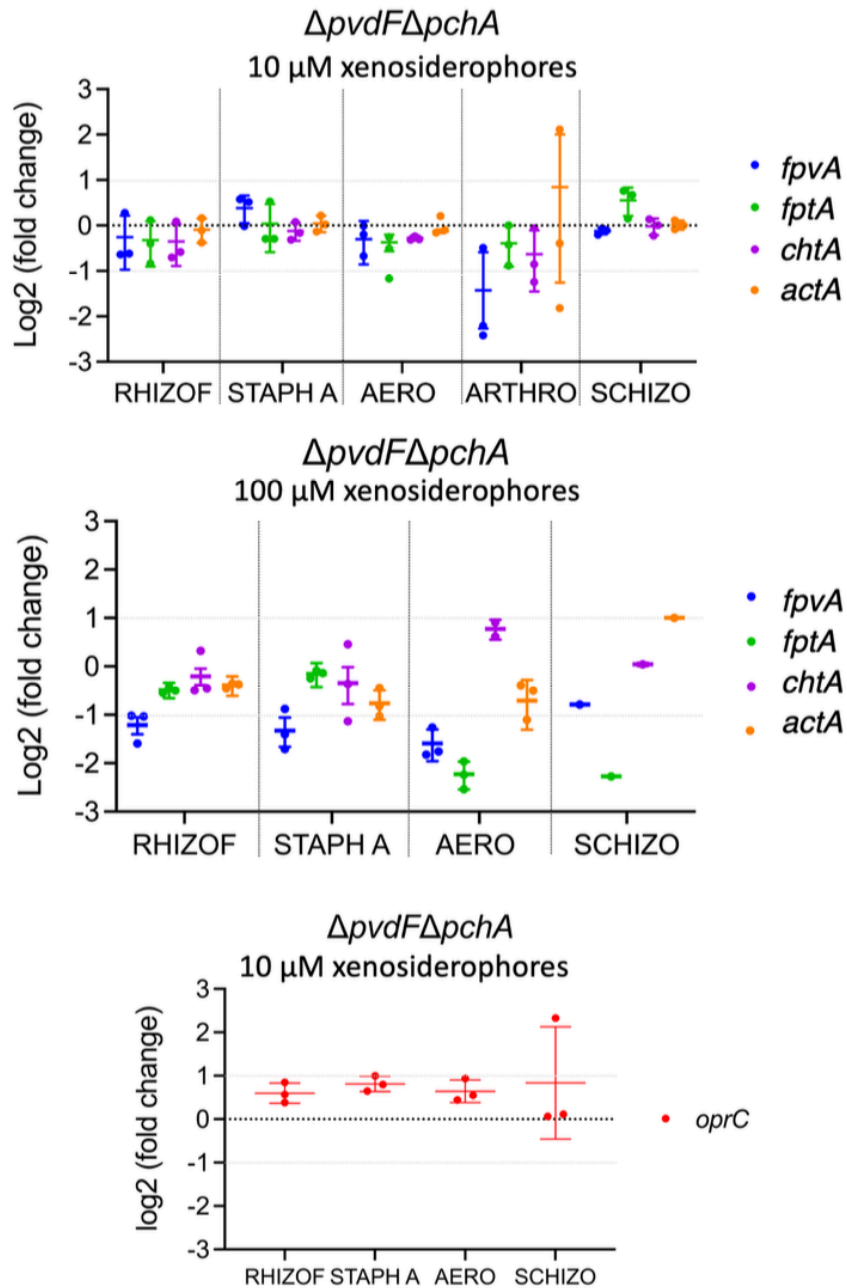
---

**Table S4. TBDTs present in the *P. aeruginosa* PAO1 genome.**

Gene	Name	Ligand	Regulation	Reference
PA0151	-	-	Sigma/anti-sigma factors	[3]
PA0192	-	-		[3]
PA0434	-	-		[3]
PA0470	FiuA	Ferrichrome, ferrichrocin, Fusigen, Rhodotorulic acid	Sigma/anti-sigma factors	[4,5]
PA0781	-	-		[3]
PA0931	PirA	Enterobactin, mono catechol	Two component systems	[6,7]
PA1271	BtuB	Cobalamine		[3]
PA1302	HxuA	Haem	Sigma/anti-sigma factors	[8]
PA1322	PfuA	-		[3]
PA1365	-	-	Sigma/anti-sigma factors	[3]
PA1613	-	-		[3]
PA1910	FemA	Mycobactins, carboxymycobactins	Sigma/anti-sigma factors	[9]
PA1922	CirA	-		[3]
PA2057	SppR	-	Sigma/anti-sigma factors	[10]
PA2070	-	-		[3]
PA2089	-	-	Sigma/anti-sigma factors	[3]
PA2289	-	-		[3]
PA2335	OptO	-		[3]
PA2398	FpvA	Pyoverdine	Sigma/anti-sigma factors	[11]
PA2466	FoxA	Ferrioxamine B, Nocardamine	Sigma/anti-sigma factors	[4,12]
PA2590	-	-		[3]
PA2688	PfeA	Enterobactin	Two component systems	[13]
PA2911	-	-		[3]
PA3268	ActA	Rhizoferrin, Staphyloferrin A	AraC regulators	This study
PA3408	HasR	HasAp-haem	Sigma/anti-sigma factors	[14]
PA3790	OprC	Copper		[3]
PA3901	FecA	Citrate	Sigma/anti-sigma factors	[15]
PA4156	FvbA	Vibriobactin		[16]
PA4168	FpvB	Pyoverdine, ferrichrome, ferrioxamine B		[17,18]
PA4221	FptA	Pyochelin	AraC regulators	[19]
PA4514	PiuA	Mono catechol		[7]
PA4675	ChtA	Aerobactin, Arthrobactin Schizokinen		[20] This study
PA4710	PhuR	Haem		[14]
PA4837	CntO	Pseudopaline		[21]
PA4897	OptI	-	Sigma/anti-sigma factors	[3]



**Figure S1. A. Differential proteomic analyses of *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  grown in the presence of 10  $\mu$ M SCHIZO, STAPH A, AERO, or RHIZOF.**  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strains were grown in CAA medium, with or without 10  $\mu$ M SCHIZO, STAPH A, AERO, or RHIZOF, for 8 h and differential proteomic expression analyzed. The average values measured in CAA medium without xenosiderophores were plotted against the average values in CAA supplemented with xenosiderophores. **A-C.** Heat maps of the TBDTs showing a change in their expression (**A**), as well as proteins involved in the pyochelin- (**B**) and pyoverdine-dependent (**C**) iron-uptake pathways. In these heat maps, we chose to show proteins for which a change in the level of expression was observed in one of the conditions analyzed: the darker the shade of red, the more the expression of the protein is repressed; the darker the shade of blue, the more the expression of the protein is induced. ns: data not significant; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$



**Figure S2. Quantitative real-time PCR on *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  grown in the presence or absence of SCHIZO, STAPH A, AERO, ARTHRO, or RHIZOF.** The  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain was grown in the presence or absence of 10  $\mu M$  or 100  $\mu M$  SCHIZO, STAPH A, AERO, ARTHRO, or RHIZOF. Gene transcription was normalized using the *uvrD* and *rpsL* reference genes. The log<sub>2</sub> ratios between the values obtained in the presence of the xenosiderophores and the condition without xenosiderophores are shown. The data show the results of three independent experiments, as well as the mean of the experiment. *fpvA* encodes the TBDT of ferri-pyoverdine, *fptA* the TBDT of ferri-pyochelin, *fecA* the TBDT of ferri-citrate, and *oprC* a TBDT involved in copper uptake.

## REFERENCES

- 1 Gasser V, Baco E, Cunrath O, August PS, Perraud Q, Zill N, Schleberger C, Schmidt A, Paulen A, Bumann D, Mislin GLA & Schalk IJ (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.
- 2 Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL & Mekalanos JJ (2005) ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 8006–8011.
- 3 Cornelis P & Bodilis J (2009) A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environ Microbiol Rep* **1**, 256–62.
- 4 Llamas MA, Sparrius M, Kloet R, Jimenez CR, Vandenbroucke-Grauls C & Bitter W (2006) The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 1882–91.
- 5 Hannauer M, Barda Y, Mislin GL, Shanzer A & Schalk IJ (2010) The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome. *J Bacteriol* **192**, 1212–20.
- 6 Ghysels B, Ochsner U, Mollman 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**, 167–74.
- 7 Moynié L, Luscher A, Rolo D, Pletzer D, Tortajada A, Weingart H, Braun Y, Page MGP, Naismith JH & Köhler T (2017) Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.
- 8 Otero-Asman JR, García-García AI, Civantos C, Quesada JM & Llamas MA (2019) *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem. *Environ Microbiol*. **21**, 4629-4647.



- 9 Llamas MA, Mooij MJ, Sparrius M, Vandenbroucke-Grauls CM, Ratledge C & Bitter W (2008) Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol* **67**, 458–72.
- 10 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.
- 11 Poole K, Neshat S & Heinrichs D (1991) Pyoverdine-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *FEMS Microbiol Lett* **62**, 1–5.
- 12 Normant V, Josts I, Kuhn L, Perraud Q, Fritsch S, Hammann P, Mislin GLA, Tidow H & Schalk IJ (2020) Nocardamine-Dependent Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Exclusive Involvement of the FoxA Outer Membrane Transporter. *ACS Chem Biol* **15**, 2741–2751.
- 13 Poole K, Young L & Neshat S (1990) Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**, 6991–6.
- 14 Smith AD & 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.
- 15 Marshall B, Stintzi A, Gilmour C, Meyer J-M & Poole K (2009) Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology (Reading, Engl)* **155**, 305–315.
- 16 Elias S, Degtyar E & Banin E (2011) FvbA is required for vibriobactin utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **157**, 2172–80.
- 17 Ghysels B, Dieu BT, Beatson SA, Pirnay JP, Ochsner UA, Vasil ML & Cornelis P (2004) FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**, 1671–80.
- 18 Chan DCK & Burrows LL (2023) *Pseudomonas aeruginosa* FpvB Is a High-Affinity Transporter for Xenosiderophores Ferrichrome and Ferrioxamine B. *mBio* **14**, e0314922.

- 19 Ankenbauer RG & Quan HN (1994) FptA, the Fe(III)-pyochelin receptor of *Pseudomonas aeruginosa*: a phenolate siderophore receptor homologous to hydroxamate siderophore receptors. *J Bacteriol* **176**, 307–19.
- 20 Cuiv PO, Clarke P & O’Connell M (2006) Identification and characterization of an iron-regulated gene, *chtA*, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **152**, 945–54.
- 21 Lhospice S, Gomez NO, Ouerdane L, Brutesco C, Ghssein G, Hajjar C, Liratni A, Wang S, Richaud P, Bleves S, Ball G, Borezée-Durant E, Lobinski R, Pignol D, Arnoux P & Voulhoux R (2017) *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Sci Rep* **7**, 17132.

Chapitre II : Utilisation des produits de  
dégradation de la PCH comme  
sidérophores par *P. aeruginosa*



### Article N°3: Structure of the outer membrane transporter FemA and its role in the uptake of ferric dihydro-aeruginic acid and ferric aeruginic acid in *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* produit des sidérophores, la PVD et la PCH. Contrairement à la PVD, stable en milieu biologique, la PCH est sujette à une hydrolyse spontanée au niveau de son cycle thiazolidine, conduisant à la formation de produits de dégradation tels que l'acide aéruinoïque (AA) ou encore l'acide dihydroaéruinoïque (DHA). Des travaux récents ont également montré que ces dérivés sont capables de chélater le fer et de stimuler la croissance de *P. aeruginosa* lorsqu'ils sont présents dans son environnement, suggérant un rôle potentiel en tant que sidérophores (Kaplan *et al.*, 2021). L'objectif de notre étude a été d'identifier le TBDT impliqué dans l'import du fer par l'AA et le DHA chez *P. aeruginosa*, ainsi que de déterminer les conditions dans lesquelles la bactérie utilise ces composés comme sidérophores.

Dans un premier temps, la stabilité chimique de la PCH a été évaluée par spectrométrie de masse après une incubation sur la nuit dans le milieu CAA (milieu carencé en fer). **Ces analyses ont montré que la PCH subit une hydrolyse suivie d'une oxydation spontanée en solution, au niveau de son motif thioaminal, conduisant à la formation de dérivés tels que l'AA, indépendamment de la présence de *P. aeruginosa*.**

Des analyses de protéomique différentielle et de quantification des transcrits par qRT-PCR ont ensuite été réalisées pour déterminer si l'expression d'un TBDT est induite en présence d'AA, de DHA ou de PCH. Pour ce faire, une souche de *P. aeruginosa* incapable de produire ses propres sidérophores ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ) a été utilisée, afin de contrôler la quantité de sidérophores présente. Cette souche a été cultivée en présence ou en absence de 10  $\mu$ M de chacune des molécules testées. **Les résultats indiquent que la présence d'AA, de DHA ou de PCH induit l'expression de FemA.** FemA a été précédemment décrit comme le TBDT de la ferri-mycobactine chez *P. aeruginosa* (Llamas *et al.*, 2008). Cette induction n'est observée qu'en absence de production de la PVD, ce qui suggère que l'AA et le DHA possèdent une affinité plus faible pour le fer que la PVD, et qu'ils seraient utilisés comme sidérophores uniquement en absence de production de PVD.

Afin de confirmer le rôle de FemA dans l'import du fer par l'AA et le DHA, des expériences de cinétique de croissance ont été menées selon la même approche que celle décrite précédemment. Brièvement, les souches  $\Delta pvdF\Delta pchA$  délétées ou non des gènes *femA* et *fptA*, ont été cultivées en milieu CAA en présence ou en absence de 10  $\mu\text{M}$  d'AA, de DHA ou de PCH. **Ces expériences ont permis de confirmer que *P. aeruginosa* utilise l'AA et le DHA pour accéder au fer via le TBDT FemA.** Concernant l'AA, la délétion de *femA* n'inhibe pas totalement la croissance, suggérant que les complexes ferriques de l'AA pourraient également traverser la membrane externe via un autre TBDT non identifié ou des porines. Pour la PCH-ferrique, FptA est bien le TBDT impliqué dans son import, tandis que FemA serait uniquement responsable de l'import du fer via les produits de dégradation de la PCH, cette dernière se dégradant spontanément dans le milieu de culture. L'ensemble de ces résultats a été confirmé par des expériences de transport de  $^{55}\text{Fe}$  chez les différents mutants.

Afin de mieux comprendre dans quelles conditions *P. aeruginosa* utilise l'AA et le DHA pour accéder au fer, des souches rapportrices fluorescentes, capables ou non de produire la PVD et/ ou la PCH, ont été utilisées pour déterminer les conditions optimales d'expression de *femA* en fonction des concentrations en AA, DHA ou PCH. Les données obtenues ont permis de modéliser l'expression de *femA* selon divers paramètres, en collaboration avec le Dr M. Madec (ICube, Illkirch), permettant d'évaluer finement la réponse transcriptionnelle de *femA* à la présence des différentes molécules. Il en ressort que l'AA, le DHA et la PCH induisent l'expression de *femA* uniquement dans une souche déficiente en la production de PVD. L'induction de *femA* débute à partir de 4  $\mu\text{M}$  d'AA, 10  $\mu\text{M}$  de DHA et 30  $\mu\text{M}$  de PCH. **Ces résultats montrent que l'AA est plus efficace que le DHA ou la PCH pour induire l'expression de *femA*.**

Enfin, la résolution de la structure aux rayons X de FemA, en absence ou en présence des formes ferriques d'AA, de DHA et de la PCH, réalisée en collaboration avec le Dr L. Moynié (The Rosalind Franklin Institute, Oxford), a révélé que FemA lie les complexes ferri-AA et ferri-DHA avec une stœchiométrie de 2 : 1 (sidérophore : Fe). Les interactions clés entre FemA et les complexes AA-Fe et DHA-Fe sont conservées, la spécificité de reconnaissance et donc de transport étant principalement déterminée par l'une des deux molécules de sidérophore du complexe. **Bien qu'aucun transport de**

**fer par la PCH *via* FemA n'ait été observé, le complexe ferri-PCH se lie à FemA de manière similaire aux complexes ferriques de l'AA et du DHA.**

Nos travaux montrent que, dans des conditions de carence modérée en fer, lorsque seule la PCH est produite, celle-ci se dégrade spontanément en AA et DHA. Ces produits de dégradation, capables de chélater le fer, induisent alors l'expression de *femA*, permettant l'import du fer *via* ce transporteur et ces produits de dégradation. *P. aeruginosa* optimise ainsi la production de PCH, en tirant parti de ses produits de dégradation, l'AA et le DHA, pour maintenir sa capacité à acquérir du fer même lorsque la PCH est dégradée.

# Structure of the Outer Membrane Transporter FemA and Its Role in the Uptake of Ferric Dihydro-Aeruginic Acid and Ferric Aeruginic Acid in *Pseudomonas aeruginosa*

Virginie Will,<sup>¶</sup> Lucile Moynié,<sup>\*,¶</sup> Elise Si Ahmed Charrier, Audrey Le Bas, Lauriane Kuhn, Florian Volck, Johana Chicher, Hava Aksoy, Morgane Madec, Cyril Antheaume, Gaëtan L. A. Mislin, and Isabelle J. Schalk<sup>\*</sup>

Cite This: *ACS Chem. Biol.* 2025, 20, 690–706

Read Online

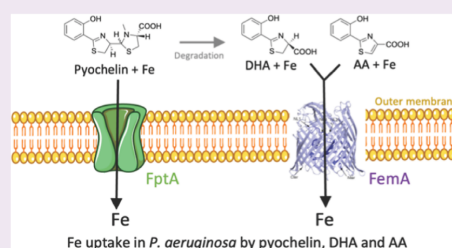
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Iron is essential for bacterial growth, and *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes the siderophores pyochelin (PCH) and pyoverdine to acquire it. PCH contains a thiazolidine ring that aids in iron chelation but is prone to hydrolysis, leading to the formation of 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde (IQS). Using mass spectrometry, we demonstrated that PCH undergoes hydrolysis and oxidation in solution, resulting in the formation of aeruginic acid (AA). This study used proteomic analyses and fluorescent reporters to show that AA, dihydroaeruginic acid (DHA), and PCH induce the expression of *femA*, a gene encoding the ferri-mycobactin outer membrane transporter in *P. aeruginosa*. Notably, the induction by AA and DHA was observed only in strains unable to produce pyoverdine, suggesting their weaker iron-chelating ability compared to that of pyoverdine. <sup>55</sup>Fe uptake assays demonstrated that both AA-Fe and DHA-Fe complexes are transported via FemA; however, no uptake was observed for PCH-Fe through this transporter. Structural studies revealed that FemA is able to bind AA<sub>2</sub>-Fe or DHA<sub>2</sub>-Fe complexes. Key interactions are conserved between FemA and these two complexes, with specificity primarily driven by one of the two siderophore molecules. Interestingly, although no iron uptake was noted for PCH through FemA, the transporter also binds PCH-Fe in a similar manner. These findings show that under moderate iron deficiency, when only PCH is produced by *P. aeruginosa*, degradation products AA and DHA enhance iron uptake by inducing *femA* expression and facilitating iron transport through FemA. This provides new insights into the pathogen's strategies for iron homeostasis.



## INTRODUCTION

Iron is an essential nutrient for the growth of most microorganisms. Despite its abundance in the earth's crust, its availability to bacteria is limited. Indeed, under physiological pH and aerobic conditions, iron predominantly exists as poorly soluble ferric hydroxides. During infections in a eukaryotic host, this scarcity is further exacerbated by host proteins sequestering iron, resulting in a free iron(III) concentration as low as  $10^{-18}$  to  $10^{-24}$  M.<sup>1</sup> To overcome this, bacteria have evolved efficient iron uptake systems, with siderophore-mediated iron acquisition being widespread among them.<sup>2–4</sup> Siderophores, secondary metabolites secreted by bacteria, are distinguished by their exceptionally high affinity for iron, enabling them to effectively facilitate iron uptake.<sup>5,6</sup> Although their chemical structures vary, siderophores typically contain chelating groups like catechol, hydroxamate, hydroxy-acid, 2-hydroxyphenyl-thiazoline or 2-hydroxyphenyl-oxazoline,<sup>5,6</sup> giving them this strong binding capacity for iron(III). Once iron is chelated, siderophore-iron complexes are recognized by specific TonB-dependent transporters (TBDTs) on the bacterial surface of Gram-negative

bacteria.<sup>7</sup> These transporters import ferric complexes into the cell, with energy provided by the inner membrane TonB machinery—a complex of ExbB, ExbD, and TonB proteins.<sup>8–10</sup> Powered by the proton motive force, this machinery energizes TBDTs, enabling ferric-siderophore uptake. TBDTs are highly selective, recognizing specific siderophores or those with closely related structures.<sup>7,11,12</sup> Iron release from siderophores occurs in the periplasm or cytoplasm, depending on the bacterial species, often involving iron reduction and subsequent siderophore hydrolysis or enzymatic modification.<sup>13</sup>

The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* produces two siderophores, pyochelin (PCH) and pyoverdine.<sup>14–16</sup> Additionally, it efficiently utilizes a wide range of

Received: December 4, 2024

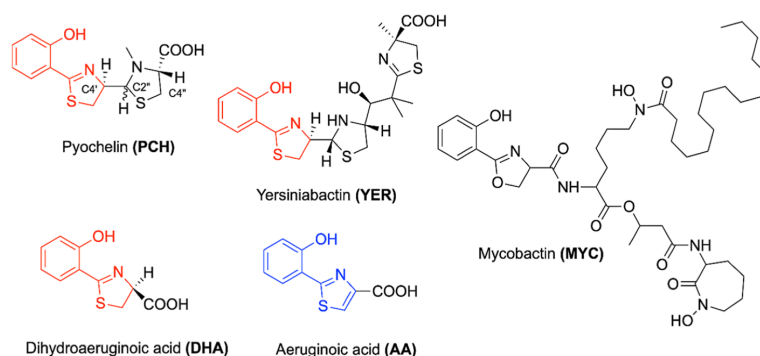
Revised: January 28, 2025

Accepted: February 4, 2025

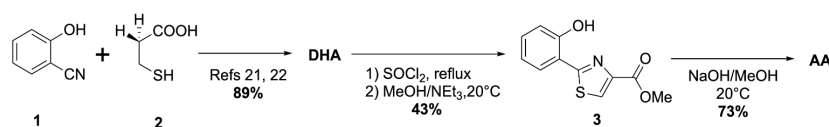
Published: March 4, 2025







**Figure 1.** Structures of pyochelin (PCH), yersiniabactin (YER), mycobactin (MYC), dihydroaeruginic acid (DHA), aeruginic acid (AA). 2-hydroxyphenyl-thiazoline and 2-hydroxyphenyl-thiazole motives are, respectively, colored in red and blue.



**Figure 2.** Synthesis of DHA and AA.

xenosiderophores—siderophores produced by other bacteria or fungi—through a process known as siderophore piracy.<sup>3</sup> This is enabled by 19 genes in the *P. aeruginosa* genome encoding TBDTs dedicated to iron acquisition.<sup>3,17</sup> For example, FptA mediates ferri-PCH uptake,<sup>18,19</sup> while FpvA and FpvB handle ferri-pyoverdine uptake.<sup>20–22</sup> For xenosiderophores, PfeA facilitates iron uptake via enterobactin,<sup>23,24</sup> FvbA via vibriobactin,<sup>25</sup> PirA and PiuA via monocatechol-type siderophores,<sup>26–29</sup> and FoxA and FiuA via hydroxamate siderophores such as nocardamine, desferrioxamines, and ferrichrome derivatives,<sup>12,30–33</sup> ActA handles hydroxyacid-type siderophores like rhizoferrin,<sup>11</sup> ChtA targets mixed hydroxamate and hydroxy acid siderophores,<sup>11,34</sup> and FemA mediates ferri-mycobactin (MYC) uptake<sup>35</sup> (Figure 1). Finally, FpvB is involved in the uptake of various hydroxamate siderophores and mixed siderophores such as pyoverdine, which contains both catechol and hydroxamate groups.<sup>12,21,36</sup> *P. aeruginosa*'s ability to utilize diverse siderophores from different sources is crucial to its dominance in various environments. It detects specific xenosiderophores through mechanisms involving sigma and anti-sigma factors, two-component systems, or AraC-like regulators.<sup>29,35,37–40</sup> In response, the bacterium induces the expression of the appropriate uptake system, including specific TBDTs.<sup>11,12,32,35,39,41,42</sup>

Recent studies have indicated that dihydroaeruginic acid (DHA) and aeruginic acid (AA), along with related compounds, serve as siderophores for iron uptake into *P. aeruginosa* cells,<sup>43–45</sup> but without identifying the TBDTs involved and without giving any insights under which conditions these molecules could be used by *P. aeruginosa* to access iron. Like PCH and yersiniabactin (YER), DHA features a 2-hydroxyphenyl-thiazoline scaffold when AA is based on a 2-hydroxyphenyl-thiazole scaffold (Figure 1). Both 2-hydroxyphenyl-thiazoline and 2-hydroxyphenyl-thiazole motifs possess iron chelation properties. DHA has been identified as a shunt product of the PCH biosynthesis.<sup>44,46</sup>

The goal of this study was to identify the TBDT responsible for importing iron into *P. aeruginosa* cells via AA and DHA,

and to determine the conditions under which these compounds behave as siderophores for the bacterium. First, mass spectrometry confirmed that AA is produced through the hydrolysis of PCH in aqueous environments. Using differential proteomics and fluorescent reporters, we found that AA and DHA induce the expression of *femA* under iron-starvation conditions—*femA* was previously associated with iron transport by MYC siderophores.<sup>35</sup> *femA* expression was also induced by PCH. Additionally, we demonstrated that both DHA and AA, but not PCH, promote iron uptake into *P. aeruginosa* via the FemA TBDT. We also solved the X-ray structure of FemA in complex with ferri-AA, ferri-DHA, and ferri-PCH, which provided critical insights into the interaction mechanism between the transporter and these compounds.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Synthesis of DHA and AA.** DHA was synthesized by condensation of 2-hydroxybenzimidazole **1** with (*S*)-cysteine hydrochloride **2** in hydro-methanolic conditions (phosphate buffer 1M, pH 6.4/MeOH) according to a previously published procedure (Figure 2).<sup>47,48</sup> DHA was obtained in 89% yield. Synthesis of AA was performed starting from DHA. The latter compound was treated with thionyl chloride, and the resulting acyl chloride was not isolated and directly reacted with a solution of triethylamine in methanol. Intriguingly, we straightforwardly isolate the oxidized derivative **3** in 43% yield. This direct conversion was never described in the literature as a compound. A further saponification of **3** with sodium hydroxide in hydro-methanolic medium led to the expected AA **5** isolated in 73% yield.

**AA Is a Degradation Product of PCH.** PCH, one of the two siderophores produced by *P. aeruginosa*, was chemically synthesized following a protocol developed by our team.<sup>47,48</sup> PCH contains three asymmetric centers: C4', C2'', and C4'' (Figure 1). Partial epimerization occurs at the C4' chiral center during synthesis. The C2'' chiral center within the thiazolidine ring exists as a thioaminal, making it inherently epimerizable.<sup>49,50</sup> Meanwhile, the configuration of the C4'' chiral center remains unchanged during synthesis. Consequently, the PCH

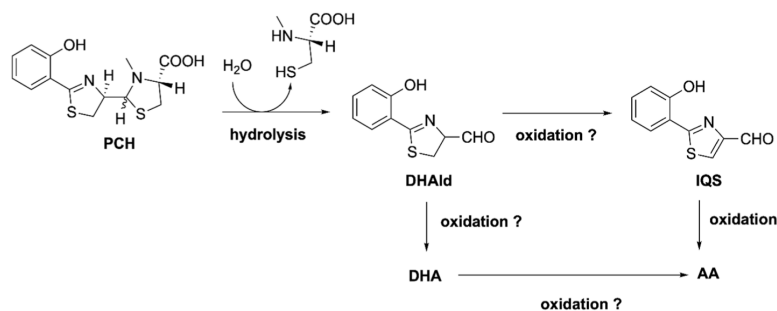


Figure 3. Putative degradation process of PCH into DHAlD, DHA, IQS, and AA in solution.

used in this work is a mixture of four stereoisomers. Analysis of PCH samples using reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry confirmed the presence of the four stereoisomers and the absence of DHA and AA. However, two aldehydes, 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde also called IQS and DHAlD were detected as traces contaminants (below 1%) (Figures S7, S8 and 3 and Table 1). IQS has been identified in previous studies.<sup>51,52</sup>

**Table 1. Qualitative Detection of the Degradation Products of PCH in CAA Medium, in the Absence or in the Presence of a Culture of  $\Delta pvdF\Delta pchA$ , Using Mass Spectrometry<sup>a</sup>**

conditions	PCH	DHA	AA	IQS	DHAlD
CAA	ND	ND	ND	ND	ND
CAA, PCH	detected	ND	detected	detected	ND
CAA, $\Delta pvdF\Delta pchA$	ND	ND	ND	ND	ND
CAA, $\Delta pvdF\Delta pchA$ , PCH	detected	ND	detected	detected	detected

<sup>a</sup>Mass spectrometry was used to qualitatively identify the degradation products of PCH after 15 h of incubation in CAA medium or in the presence of  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells. PCH was present at a concentration of 10  $\mu$ M. Cells labeled 'detected' indicate the presence of compounds, while 'ND' signify that compounds were not detected.

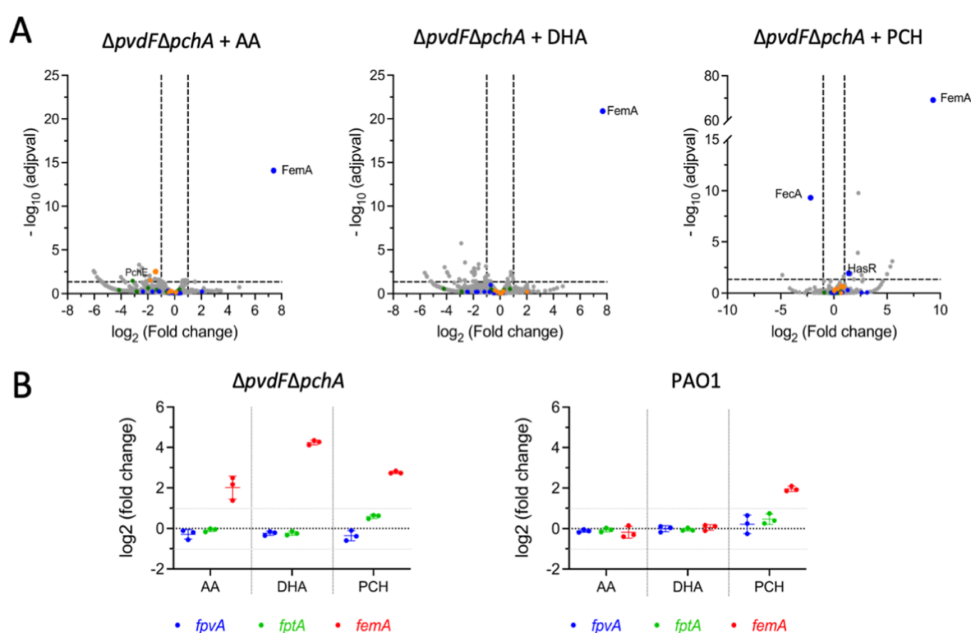
Using the same analytical technique, chemical stability of PCH was further assessed after incubation at a concentration of 10  $\mu$ M in Casamino acid medium (CAA), at 30 °C for 15 h (the medium and temperature used to grow *P. aeruginosa* under iron starved conditions). Mass spectrometry analysis of pure CAA does not highlight the presence of PCH or any of its degradation process (Figures S9, S10 and Table 1). Mass spectrometry analysis revealed that after 15 h of incubation of PCH in CAA, several products can be detected, notably IQS and AA. DHA and DHAlD were not detected under these conditions (Figures S11, S12 and Table 1). As it was already demonstrated by Hertweck and co-workers, IQS results from the hydrolysis of the thioaminal moiety of PCH and a subsequent oxidation (Figure 3).<sup>53</sup> On the other hand, the degradation of PCH into AA has not been described. Additional experiments are needed to fully understand how CAA medium promotes hydrolysis and/or oxidation steps leading to compounds DHAlD, DHA, IQS, and AA (Figure 3).

To investigate whether the presence of *P. aeruginosa* can influence the degradation process, we cultivated a *P. aeruginosa* strain incapable of producing its own siderophores, pyoverdine and PCH ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ , deletion on *pvdF* and *pchA*, two

genes involved in the biosynthesis of pyoverdine and PCH, respectively, Table S1), in CAA medium in the absence or presence of 10  $\mu$ M PCH. We intentionally used a strain deficient in pyoverdine and PCH production to prevent contamination from PCH produced by the strain and to ensure that the strain utilized the added PCH in the growth media to access iron rather than relying on its own siderophores. After 15 h of incubation, IQS, DHAlD, and AA were detected in the growth media, while DHA was not detected (Figures S15, S16 and Table 1). AA appears to be the ultimate degradation product of PCH (Figure 3). As a control, the same experiment was repeated with *P. aeruginosa* cells grown in CAA medium without PCH. As expected, neither PCH nor the degradation compounds shown in Figure 3 were observed when the bacteria were cultivated alone (Figures S13, S14 and Table 1).

These data, summarized in Table 1, demonstrate that PCH in solution undergoes degradation with AA as the ultimate oxidation product. This degradation appears to be spontaneous and independent of the presence of bacteria. The conversion of PCH to AA involves hydrolysis, producing DHAlD, followed by two successive oxidation steps (the formation of a double bond and the oxidation of an aldehyde to a carboxylate). The oxidation of thiazoline to thiazole (double bond formation) by atmospheric oxygen has been reported and shown to be significantly enhanced by the presence of an aromatic ring at position 2.<sup>54</sup> Similarly, the aerobic oxidation of aldehydes (e.g., IQS) to the corresponding carboxylates (e.g., AA) has also been documented.<sup>55</sup> The mechanisms and sequences of these two oxidation reactions remain unclear and are currently under investigation. The presence of this compound in *P. aeruginosa* culture broth raised the question of its uptake by the bacteria as it was previously demonstrated for the closely related DHA.<sup>43,44</sup>

**Presence of PCH, AA, and DHA Induces the Transcription and Expression of *femA*.** An effective strategy to identify the TBDT in *P. aeruginosa* used by a xenosiderophore to import iron is to use differential proteomics to determine if any TBDT genes in the *P. aeruginosa* genome show increased expression when the bacterium is grown in the presence of the tested xenosiderophore. Indeed, it is well established that the presence of certain xenosiderophores in the environment of *P. aeruginosa* triggers the expression of their corresponding TBDTs.<sup>11,12,28,32,35,41,56</sup> For instance, the presence of ferrichrome induces *fiuA* expression,<sup>41,56</sup> nocardamine triggers *foxA* expression,<sup>32</sup> and enterobactin induces *pfeA* expression.<sup>41,57,58</sup> Given that AA and DHA can be utilized as siderophores by *P. aeruginosa*,<sup>43–45</sup> we aimed to investigate whether the presence of DHA and AA induces the expression of a specific TBDT involved in the uptake of the ferric forms of



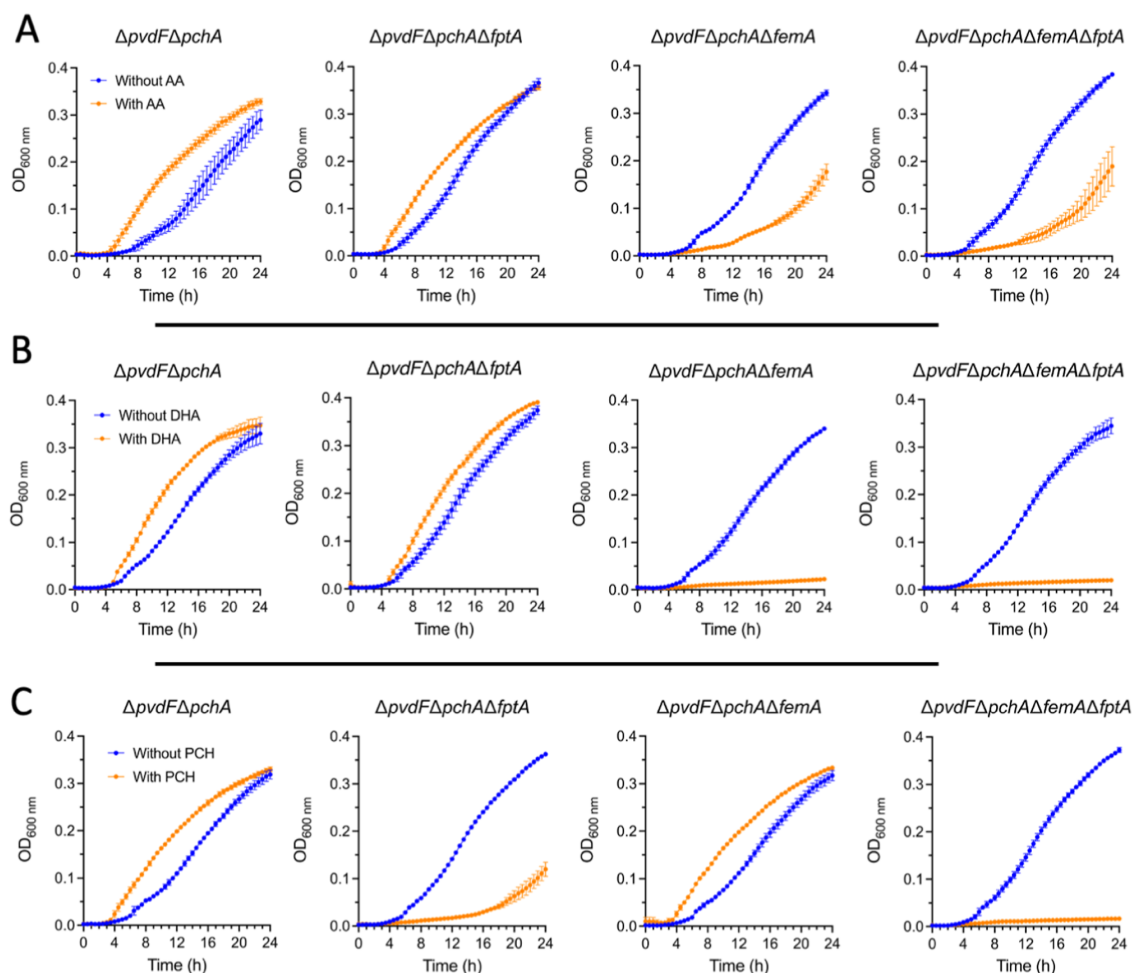
**Figure 4.** (A). Modulation of protein expression in *P. aeruginosa* strains unable to produce pyoverdine and PCH in the presence of AA, DHA, and PCH. Proteomic analyses were conducted on the  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain grown for 8 h in CAA medium supplemented with 10  $\mu\text{M}$  of AA, DHA, or PCH. Median values measured for the cultures supplemented with 10  $\mu\text{M}$  AA, DHA, or PCH were plotted against those measured without the supplementation of AA, DHA, or PCH. The three volcano plots display  $\log_2$ -fold changes in protein abundances and corresponding  $-\log_{10}$ -transformed *p*-values relative to untreated control samples. Proteins associated with the PCH pathway are denoted by orange dots, those linked to the pyoverdine pathway by green dots, and the TBDTs by blue dots. (B). Transcription of the *fpvA*, *fptA*, and *femA* genes in the presence of 10  $\mu\text{M}$  AA, DHA, or PCH. RT-qPCR was conducted on RNA isolated from *P. aeruginosa* PAO1 and  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells grown in CAA medium, both in the absence and presence of 10  $\mu\text{M}$  AA, DHA, or PCH, for 8 h. The results are presented as the ratio between the values obtained in the presence of 10  $\mu\text{M}$  AA, DHA, or PCH and those obtained in the absence of the compounds. *fpvA* encodes the TBDT of pyoverdine-Fe, *fptA* encodes the TBDT of PCH-Fe, and *femA* encodes the TBDT of ferri-mycobactin. Data from both panels are normalized relative to the reference gene *uvrD* and are representative of three independent experiments.

DHA and AA. To achieve this, we employed a differential proteomic approach, comparing the proteomes of *P. aeruginosa* grown in the absence and presence of 10  $\mu\text{M}$  DHA, AA, or PCH. The culture medium used was CAA, an iron-restricted medium (20 nM of iron).<sup>59</sup> We utilized again the *P. aeruginosa* strain lacking endogenous siderophore production ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ , Table S1) to control the levels of PCH, AA and DHA in the culture. TBDT proteins, even though they are membrane proteins, are easily detected by proteomic approaches, as shown previously.<sup>28,32,41,57,60,61</sup> Upon comparing the proteomes of the  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain cultured during 8 h in the absence and presence of DHA or AA, we observed a substantial induction of *femA* expression (fold change of 7.7 and 7.4, respectively, Figure 4A). *femA* expression has been described previously as being induced by the presence of ferri-MYC,<sup>35</sup> a siderophore sharing structural and chemical characteristics with PCH, AA, and DHA (Figure 1). No other TBDT had its expression significantly induced or repressed in the presence of DHA or AA.

Regarding the experiment conducted in the presence of PCH, comparing the proteomes of  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells grown for 8 h with and without PCH revealed an induction of *femA* expression but no induction of *fptA* expression (Figure 4A), which encodes the TBDT for ferri-PCH.<sup>18,19</sup> This lack of *fptA* induction is consistent with our previous findings.<sup>62</sup> We showed that, under iron-restricted conditions, *fptA* expression reaches its maximum in a  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain, which is unable

to produce the siderophores pyoverdine and PCH, and adding PCH does not further increase *fptA* expression.<sup>62</sup> The induction of *femA* expression in the presence of PCH is higher compared to that observed in the presence of either 10  $\mu\text{M}$  of AA or DHA after 8 h of incubation (fold change of 9.3 compared to 7.4 and 7.7, respectively, Figure 4A).

In a subsequent step, using RT-qPCR, we monitored the transcription levels of genes encoding the TBDTs FemA, FptA, and FpvA (FpvA being the TBDT for ferri-pyoverdine) for PAO1 (wild type) and  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells grown under iron-restricted conditions, both in the absence and presence of 10  $\mu\text{M}$  AA, DHA, or PCH (Figure 4B). The data revealed an induction of *femA* transcription in the  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain in the presence of AA, DHA, and PCH, with no discernible impact on *fptA* transcription, thereby corroborating the results obtained through the proteomic approach. The induction of *femA* transcription and expression appears to be more efficient with DHA compared to PCH or AA in  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells. In the case of PAO1, which synthesizes pyoverdine and PCH, *femA* transcription was induced only in the presence of PCH, and not in the presence of DHA and AA. This suggests that DHA and AA might be less effective at chelating iron in the presence of the natural siderophores pyoverdine and PCH. Conversely, the induction of *femA* transcription in the presence of PCH in the PAO1 strain may be due either to PCH itself or to higher concentrations of DHA and AA compared to the experiment with  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells grown in the presence of



**Figure 5.** Growth of  $\Delta pvdF\Delta pchA$  in the presence of AA, DHA, or PCH.  $\Delta pvdF\Delta pchA$  and its corresponding  $\Delta fptA$  and  $\Delta femA$  deletion mutants were grown in CAA medium in the absence (growth kinetics in blue) or presence (kinetics in orange) of 10  $\mu\text{M}$  DHA, AA, or PCH. Growth was followed by monitoring the optical density at 600 nm. Error bars were calculated from three independent biological replicates.

10  $\mu\text{M}$  AA or DHA. This increase in DHA and AA concentrations could result from PCH degradation, leading to levels sufficient to initiate transcription despite the presence of pyoverdine.

Altogether, these data demonstrate that the presence of AA and DHA in the growth media of *P. aeruginosa* induces the transcription and expression of *femA*, a gene encoding the TBDT FemA previously described to be involved in the uptake of ferri-MYC.<sup>55</sup> Regarding the induction of *femA* transcription and expression observed in the presence of PCH, it is difficult at this stage to conclude whether it is due to PCH itself or its degradation products.

**FemA Transports Ferri-DHA and Ferri-AA Complexes but Not PCH-Fe into *P. aeruginosa* Cells.** Given that the presence of AA or DHA in the environment of *P. aeruginosa* induces the expression of *femA*, we sought to confirm that FemA serves as the TBDT responsible for the import of iron via AA and DHA into bacterial cells. To investigate this, we employed a growth test under iron-deficient conditions (Figure 5). We utilized strains incapable of producing their own siderophores (pyoverdine and PCH) to ensure that the only

source of siderophores present would be those experimentally added.  $\Delta pvdF\Delta pchA$  and corresponding strains deleted for the *femA* and *fptA* genes were cultured in CAA medium, in the absence or presence of 10  $\mu\text{M}$  AA, DHA, or PCH, and bacterial growth was monitored at OD<sub>600 nm</sub>. Under these culture conditions, all iron present in the growth medium is chelated by the tested chelator, and for the bacteria, the only means of acquiring iron is by importing these formed complexes. As growth of  $\Delta pvdF\Delta pchA$  was observed in the presence of 10  $\mu\text{M}$  DHA or AA in CAA medium (Figure 5), it can be inferred that these two molecules can be utilized as siderophores by *P. aeruginosa* to access iron.

For DHA (Figure 5B), the deletion of the *fptA* gene had no effect on growth. However, complete growth inhibition was observed in the mutant not expressing *femA*, indicating that DHA imports iron into *P. aeruginosa* cells exclusively through FemA. For AA (Figure 5A), a 46% growth inhibition was observed in the  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA$  mutant compared to the  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain, indicating that FemA also transports iron via AA. Deletion of *fptA* in the  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA$  strain had no additional inhibitory effect on growth, suggesting that FptA

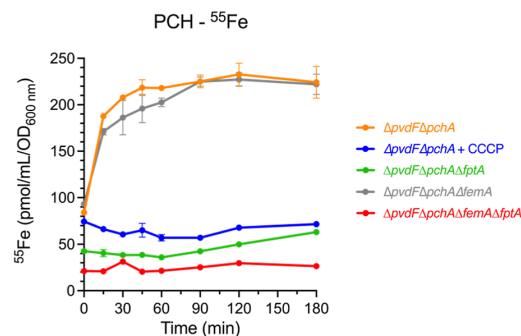


is not involved in iron import by AA. These data suggest that AA imports iron into *P. aeruginosa* cells via FemA and possibly through another unidentified transporter. Alternatively, since AA is a siderophore of small molecular weight, ferri-AA may also diffuse through the bacterial outer membrane via porins in addition to FemA-mediated uptake.

For PCH (Figure 5C), no growth inhibition was observed for single TBDT mutant  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA$ . However, in the case of  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$ , total inhibition occurred during the first 16 h of culture, after which growth resumed. The lack of growth in  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$  cells during this initial period, combined with the absence of any effect from the *femA* mutation, strongly suggests that FptA is the sole TBDT responsible for ferri-PCH uptake. The subsequent growth, commencing at 16 h, may result from iron uptake by DHA and AA, which form after 16 h as PCH degrades, or from the activation of an alternative iron acquisition pathway. To verify the latter hypothesis, we performed a differential proteomics analysis comparing the  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain cultured in the absence and presence of 10  $\mu$ M PCH for 24 h (Figures S17). The data showed an induction of *femA* expression similar to that observed at 8 h of culture in the experiment presented in Figure 4A and no induction of any other TBDT involved in iron import in *P. aeruginosa*. Moreover, as total growth inhibition was observed with the double TBDT mutant  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA\Delta fptA$  in the presence of PCH (Figure 5C), we conclude that the TBDT implicated in the resumed growth of the  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain at 16 h in the presence of PCH is FemA. These findings substantiate the role of FptA as the TBDT for PCH-Fe complexes, whereas FemA facilitates the import of ferric complexes of PCH degradation products, namely, DHA and AA.

This conclusion concerning PCH is further supported by  $^{55}\text{Fe}$  uptake assays conducted on  $\Delta pvdF\Delta pchA$  and  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$ , and  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA\Delta fptA$  strains (Figure 6). The strains were cultured in the presence of 10  $\mu$ M PCH to ensure *femA* expression. PCH was loaded with  $^{55}\text{Fe}$  and immediately utilized in the  $^{55}\text{Fe}$  uptake assay. Consequently, we presume that there is minimal degradation of PCH during the 3 h duration of the experiment, especially since the ferric form of PCH is more stable than the apo form.<sup>49,50</sup> A significant inhibition of  $^{55}\text{Fe}$  import was observed only with the two *fptA* mutant strains,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$  and  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA\Delta fptA$ , compared to the reference  $\Delta pvdF\Delta pchA$ . The *femA* mutation (assay with  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA$ ) showed no detectable effect on  $^{55}\text{Fe}$  import, indicating that FemA does not participate in iron import via PCH. If FemA was involved in iron import through PCH, residual  $^{55}\text{Fe}$  import would be expected in the  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$  mutant cells. This would indicate FemA taking over the PCH-Fe<sup>55</sup> uptake in the absence of FptA. Therefore, the growth observed after 16 h in the  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$  strain in the presence of PCH is attributable to the presence of DHA and/or AA resulting from PCH degradation (Figure 5C).

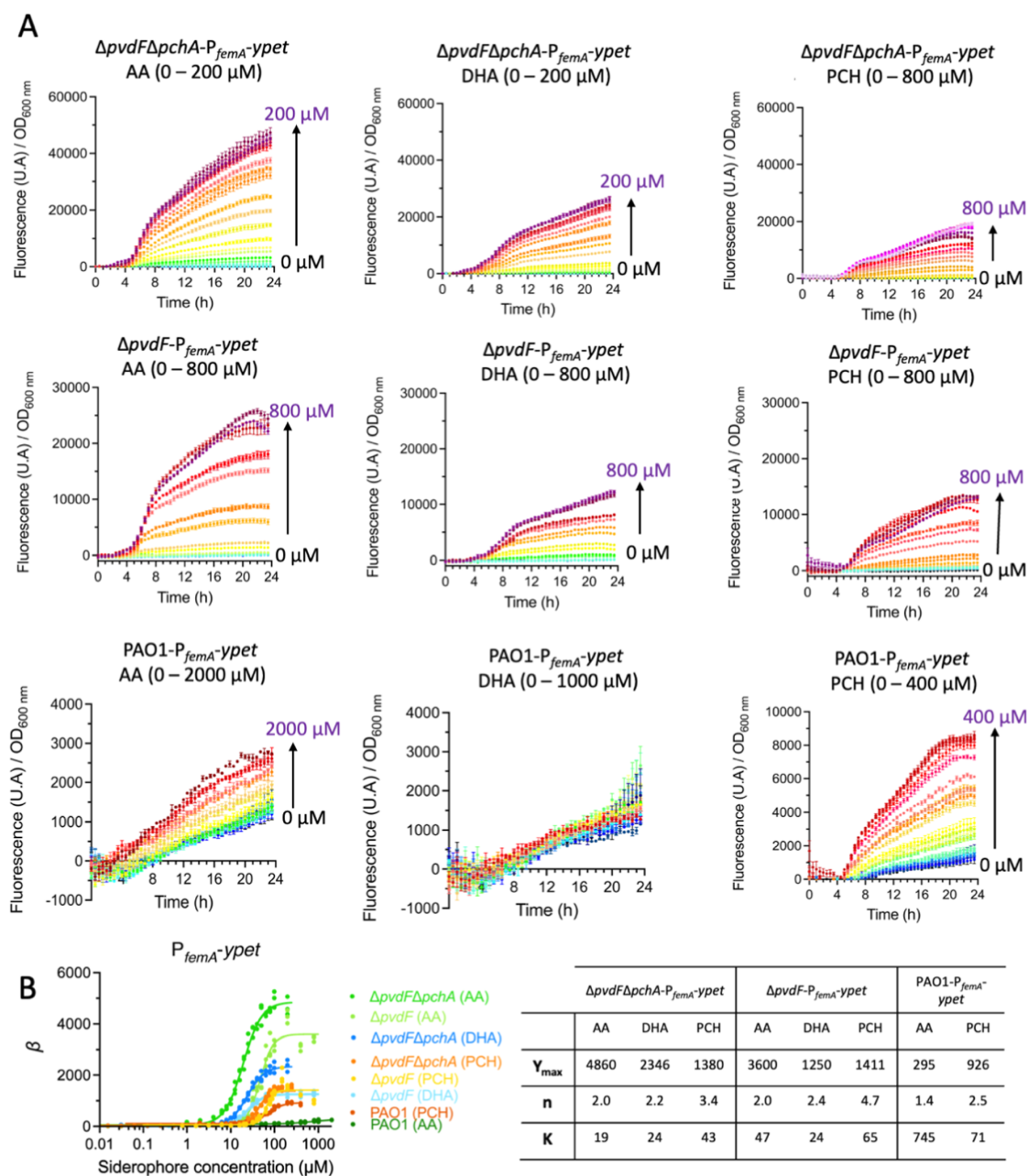
**Under what Circumstances Is *P. aeruginosa* Able to Access Iron via AA and DHA?** To better understand the conditions under which *P. aeruginosa* can use AA and DHA to access iron, we identified the optimal conditions for *femA* expression relative to AA, DHA, and PCH concentrations in *P. aeruginosa* strains, capable or not of producing pyoverdine and PCH. This experiment employed a fluorescent reporter system and a data analysis method similar to our previous work.<sup>42</sup> This



**Figure 6.**  $^{55}\text{Fe}$  uptake by *P. aeruginosa* strains mediated by PCH. *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells were grown in iron-restricted CAA medium in the presence of 10  $\mu$ M PCH, to induce expression of *fptA* and *femA*. Afterward, bacteria were incubated with 500 nM PCH- $^{55}\text{Fe}$ . The amount of  $^{55}\text{Fe}$  taken up by the bacteria was measured as a function of time. As a control, the experiment was repeated in the presence of the protonophore CCCP (200  $\mu$ M). The experiment was also repeated with the corresponding  $\Delta fptA$  and  $\Delta femA$  deletion mutants of  $\Delta pvdF\Delta pchA$  ( $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA$  and  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA\Delta fptA$ ). Error bars were calculated from three independent biological replicates. The same experiment was also conducted with cells grown in iron-restricted CAA medium supplemented with 100  $\mu$ M PCH to more strongly induce the expression of *fptA* and *femA*, yielding identical results (Figure S18).

approach enables testing of various siderophore concentrations and allows monitoring of *femA* expression throughout the entire culture period. In this system, the promoter sequence of the fluorescent protein YPet is controlled by the promoter sequences of *femA*. The promoter region of *femA* contains a Fur box, which is involved in transcriptional regulation via Fur (a transcriptional regulator sensitive to intracellular iron concentration).<sup>63–66</sup> It also includes a sequence that interacts with the sigma factor FemR. Indeed, *femA* transcription is positively regulated by the anti-sigma and sigma factors FemI and FemR.<sup>35</sup> This promoter region and the DNA sequence of YPet were inserted into the genomes of *P. aeruginosa* PAO1 and the  $\Delta pvdF$  and  $\Delta pvdF\Delta pchA$  mutants between the *glmS* and *PA5548* genes as before.<sup>42</sup> The generated strains are referred to as PAO1- $P_{femA}$ -ypet,  $\Delta pvdF$ - $P_{femA}$ -ypet, and  $\Delta pvdF\Delta pchA$ - $P_{femA}$ -ypet (Table S1). We have previously constructed similar fluorescent reporters for the promoter regions of the TBBDT-encoding genes *pfeA* and *foxA* in *P. aeruginosa* and demonstrated via qRT-PCR that (i) inserting sequences into the *P. aeruginosa* genome between the *glmS* and *PA5548* genes does not significantly affect the transcription of these two genes, (ii) adding a second promoter to the genome does not interfere with the transcription of *pfeA* or *foxA*, and (iii) the fluorescence of these reporters is proportional to the expression of the respective TBBDT of interest.<sup>42</sup> Here also, we checked using qRT-PCR that the fluorescence of YPet is proportional to that of *femA* transcription (Figure S19).

We monitored *femA* expression by tracking YPet fluorescence during the growth of PAO1- $P_{femA}$ -ypet,  $\Delta pvdF$ - $P_{femA}$ -ypet, and  $\Delta pvdF\Delta pchA$ - $P_{femA}$ -ypet in CAA medium with increasing concentrations of AA, DHA, or PCH. Bacterial growth was measured by optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub> nm), while *femA* expression was tracked by measuring YPet



**Figure 7.** *femA* expression as a function of AA, DHA, and PCH concentrations in  $PAO1-P_{femA-ypet}$ ,  $\Delta pvdF-P_{femA-ypet}$ , and  $\Delta pvdF\Delta pchA-P_{femA-ypet}$  strains. (A)  $PAO1-P_{femA-ypet}$ ,  $\Delta pvdF-P_{femA-ypet}$  and  $\Delta pvdF\Delta pchA-P_{femA-ypet}$  strains were grown in CAA medium in the absence or presence of increasing concentrations of AA, DHA, or PCH. The  $OD_{600\text{ nm}}$  and YPet fluorescence (excitation at 500 nm and emission at 540 nm) were measured (see Figures S20–S22). For each concentration of the siderophore, the fluorescence data of the control (without siderophore) was subtracted from the fluorescence of the condition of interest, and the resulting fluorescence was normalized by dividing by the corresponding  $OD_{600\text{ nm}}$  value. Three independent experiments, each with three technical replicates, were performed for each concentration of AA, DHA, and PCH tested ( $n = 3$ ). The mean and the standard deviation of the three biological replicates are shown. The  $y$ -axis is not the same for the 3 reporters, nor is the concentration gradient of AA, DHA, and PCH used. The arrow indicates the direction of fluorescence variation depending on the concentration of AA, DHA, or PCH tested. (B)  $\beta$  values. The  $\beta$  values of the  $PAO1-P_{femA-ypet}$ ,  $\Delta pvdF-P_{femA-ypet}$ , and  $\Delta pvdF\Delta pchA-P_{femA-ypet}$  strains for each biological replicate are plotted against the concentrations of AA, DHA, and PCH. The sigmoid curves were fitted using the Hill eq 2, and the obtained parameters are summarized in the table.  $y_0$ , minimum of expression;  $y_{max}$ , maximum of expression;  $n$ , the Hill coefficient, which describes the cooperativity in the studied biological system;  $K$ , the concentration of ligand ( $\mu\text{M}$ ) at which half of the maximum expression is observed.

fluorescence at 540 nm (excitation wavelength: 500 nm) over time (Figures S20–S22). For each condition, the fluorescence data were processed as follows: first, the fluorescence of the control (without siderophores) was subtracted from the fluorescence of the test condition to account for the baseline. Then, the resulting fluorescence for each condition was normalized by dividing it by the corresponding OD<sub>600 nm</sub> value (Figure 7A), providing a measure of fluorescence per bacterium. Under the assumption that the fluorescence signal is directly proportional to the concentration of YPet ( $F = k \cdot P$ , where  $F$  is the fluorescence signal and  $P$  is the concentration of YPet), the transient evolution of the fluorescence signal per bacteria can be modeled as a first-order system (1) involving the gene expression  $\beta$  (in  $\mu\text{M}/\text{h}$ ) and the degradation rate of YPet  $d$  (in  $\text{h}^{-1}$ ).

$$\frac{dP}{dt} = \beta - d \cdot P \quad (1)$$

The assessment of  $\beta$  as a function of AA, DHA, or PCH concentrations, which is the quantity of interest when talking about gene expression, from the data is then a two-step process. First, for each AA, DHA, or PCH concentration, the temporal evolution of the fluorescence per bacteria is fitted by eq 1 in order to obtain the value of  $\beta$  (Figure 7A). Then, the curves giving  $\beta$  as a function of AA, DHA, or PCH concentration (Figure 7B) are fitted by the Hill's equation eq 2 in order to obtain the quantitative features of the regulation process: basal and maximal expression ( $y_0$  and  $y_{\text{max}}$ ), effective affinity, *i.e.* the concentration at which the transition occurs ( $K$ ), steepness of the transition ( $n$ ).

$$\beta(X) = y_0 + (y_{\text{max}} - y_0) \cdot \frac{X^n}{X^n + K^n} \quad (2)$$

An increase in fluorescence, corresponding to *femA* expression, was observed in the  $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}\text{-P}_{femA}\text{-ypet}$  strain (the fluorescent reporter producing no pyoverdine and no PCH) in response to the concentrations of AA, DHA, and PCH (Figure 7A). For AA, fluorescence began to rise at 4  $\mu\text{M}$  and peaked at 80  $\mu\text{M}$ . For DHA, the increase started at 10  $\mu\text{M}$ , also reaching a maximum at 80  $\mu\text{M}$ . For PCH, fluorescence increased from 30  $\mu\text{M}$  and peaked at 200  $\mu\text{M}$ . The steepness of the response varied among the siderophores, as reflected in the Hill coefficients ( $n$  values) of 2.0, 2.2, and 3.4 for AA, DHA, and PCH, respectively. Notably, a significant difference was observed in the maximum fluorescence ( $y_{\text{max}}$ ):  $y_{\text{max}}$  was twice as high for AA compared to DHA and 3.5 times higher than that for PCH (Figure 7B). These findings indicate that in the  $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}$  strain, which lacks endogenous pyoverdine and PCH production, AA is more effective at inducing *femA* expression than DHA or PCH. *FemA* expression is initiated at lower concentrations of AA compared to DHA or PCH, the  $K$  value for AA is also lower than for the other siderophores, and more *FemA* is expressed in the presence of AA compared to DHA and PCH. The regulatory mechanisms underlying *femA* expression in response to AA, DHA, and PCH appear to be very similar, as suggested by the comparable  $n$  values and overlapping concentration ranges at which the siderophores induce expression.

These results seem inconsistent with those obtained from proteomic analyses and qRT-PCR (Figure 4). However, the latter experiments used a single siderophore concentration (10  $\mu\text{M}$ ), while the fluorescent reporter assay evaluated a full range of concentrations. At 10  $\mu\text{M}$ , *femA* expression is relatively

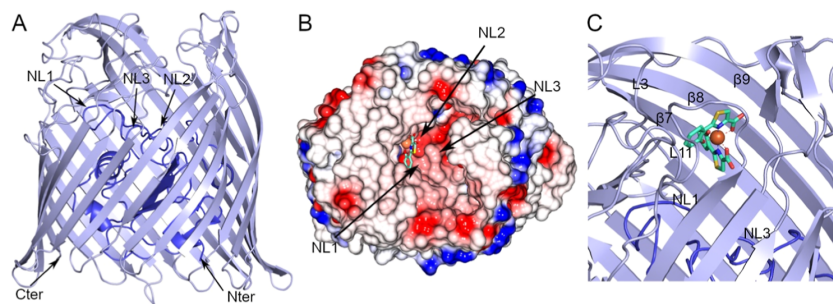
similar for AA, DHA, and PCH, but differences become more pronounced at higher concentrations (Figure 7A). Moreover, fluorescent reporters offer greater sensitivity than proteomic approaches for tracking gene expression, providing real-time data and detecting low expression levels. In contrast, proteomic methods require a higher protein abundance for detection and generally exhibit lower sensitivity.

For PAO1- $\text{P}_{femA}\text{-ypet}$  (the fluorescent reporter producing both pyoverdine and PCH) (Figure 7A), an increase in fluorescence was observed even in the absence of AA, DHA, or PCH, indicating that *femA* is already slightly expressed under iron restriction, certainly due to the PCH that is produced by the strain. However, this basal expression is much lower than the expression observed when AA or DHA is added to fluorescent reporter  $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}\text{-P}_{femA}\text{-ypet}$ . An additional increase in fluorescence occurred for PAO1- $\text{P}_{femA}\text{-ypet}$  when AA or PCH was added, but not with DHA. This increase began at 200  $\mu\text{M}$  for AA and 30  $\mu\text{M}$  for PCH. The rate of YPet synthesis,  $\beta$ , followed a sigmoidal curve for PCH, with an  $n$  value of 2.5 and an  $y_{\text{max}}$  of 926, which is 0.6 lower than in the same experiment with the  $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}\text{-P}_{femA}\text{-ypet}$  reporter. This indicates that *femA* expression reaches a lower maximum level in PAO1 in the presence of increasing PCH concentrations, likely due to the competition for iron with pyoverdine. Transcription of genes encoding TBDTs, mediated by anti-sigma and sigma factors, begins when the siderophore-iron complex binds to the corresponding TBDT, triggering a cascade that releases the anti-sigma factor, allowing the sigma factor to engage RNA polymerase and initiate transcription. Since pyoverdine has a higher affinity for iron than PCH ( $K_a$  of  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  vs  $10^{18} \text{ M}^{-2}$  for PCH),<sup>67,68</sup> fewer PCH-Fe complexes form in PAO1 than in  $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}$  cultures. For AA,  $\beta$  values remain low, indicating a very low level of *femA* expression, likely because AA is less competitive than pyoverdine and PCH produced by PAO1- $\text{P}_{femA}\text{-ypet}$  for iron chelation. No increase in YPet fluorescence was detected with DHA in PAO1- $\text{P}_{femA}\text{-ypet}$  cultures, likely because DHA does not compete effectively with pyoverdine for iron. The facts that (i) a greater increase in YPet fluorescence was observed with increasing concentrations of PCH compared to AA and (ii) no variation in fluorescence was seen with DHA confirm that PCH can induce *femA* expression.

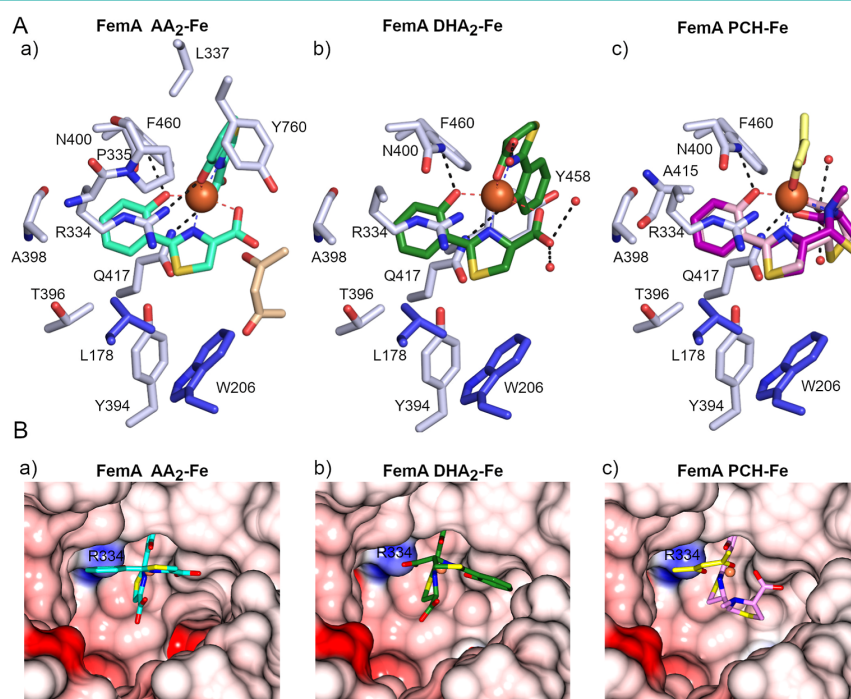
When the  $\Delta\text{pvdF}\text{-P}_{femA}\text{-ypet}$  reporter, which lacks pyoverdine production but still produces PCH, is grown in the presence of increasing concentrations of PCH (Figure 7A), the  $\text{P}_{femA}\text{-ypet}$  reporter remains active, yielding results closely resembling those obtained for the  $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}\text{-P}_{femA}\text{-ypet}$  strain. This similarity occurs because in both cases, PCH does not compete with pyoverdine for iron, as seen in the PAO1- $\text{P}_{femA}\text{-ypet}$  strain. In the experiment where  $\Delta\text{pvdF}\text{-P}_{femA}\text{-ypet}$  was cultured in the presence of either AA or DHA, we observed intermediate levels of *femA* expression compared to those seen with PAO1- $\text{P}_{femA}\text{-ypet}$  and  $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}\text{-P}_{femA}\text{-ypet}$  (Figure 7). Both AA and DHA compete for iron with pyoverdine and PCH in the assay with PAO1- $\text{P}_{femA}\text{-ypet}$ , but only with PCH when the  $\Delta\text{pvdF}\text{-P}_{femA}\text{-ypet}$  reporter is used. In contrast, there is no siderophore competition in the experiment with the  $\Delta\text{pvdF}\Delta\text{pchA}\text{-P}_{femA}\text{-ypet}$  reporter. These findings suggest that in mutants incapable of producing pyoverdine, if PCH degrades into AA and DHA, these compounds can induce *femA* expression.

In conclusion, these findings demonstrate that the presence of AA and DHA in the environment of *P. aeruginosa* induces





**Figure 8.** (A) Overall structure of FemA. The *N*-ter plug domain is colored in dark blue and the  $\beta$ -barrel in light blue. NL1–NL3 loops of the plug domain that are typically involved in siderophore recognition have been labeled. (B) View from the extracellular side of FemA in complex with AA<sub>2</sub>-Fe represented as a surface colored by electrostatic charges calculated in CCP4MG. To localize the binding site, AA is shown as sticks with carbon atoms colored cyan, sulfur yellow, nitrogen blue and oxygen red. The Fe<sup>3+</sup> is represented as an orange sphere. (C). FemA siderophore–Fe binding site. Secondary structure elements involved in the binding site have been labeled.



**Figure 9.** Comparison of FemA structures in complex with AA<sub>2</sub>-Fe, DHA<sub>2</sub>-Fe, and PCH-Fe. (A) Comparison of the binding interactions between FemA and AA<sub>2</sub>-Fe, DHA<sub>2</sub>-Fe, and PCH/neoPCH-Fe. Residues within 4.0 Å of the siderophores are displayed in light blue for residues of the  $\beta$ -barrel and dark blue for the residues of the plug domain. Carbon atoms of AA, DHA, PCH, and neoPCH are colored as cyan, dark green, pink, and purple, respectively. Hydrogen bonds are shown as black broken lines and Fe<sup>3+</sup> is represented as an orange sphere. In AA and PCH structures, one molecule of acetylacetonate coming from the source of iron is present in the binding site (colored in sand and yellow, respectively). In the PCH structure, this molecule completes the coordination sphere of the Fe<sup>3+</sup>. (B) View from the extracellular side of the binding pocket of FemA in complex with AA<sub>2</sub>-Fe (a), DHA<sub>2</sub>-Fe (b), and PCH-Fe (c) represented as a surface colored by electrostatic charges calculated in CCP4MG. Positively charged electrostatic potential is colored blue and negatively charged electrostatic potential is colored red. For clarity, neoPCH-Fe has been removed. Siderophores are shown as sticks with carbon atoms colored cyan for AA, in green for DHA, pink for PCH, sulfur yellow, nitrogen blue, and oxygen red. The Fe<sup>3+</sup> is represented as an orange sphere. One molecule of acetyl acetonate (yellow) completes the coordination sphere of the Fe<sup>3+</sup> in the PCH structure.

*femA* expression only in strains that do not produce pyoverdine. This is likely because AA and DHA have lower affinity for iron, preventing them from effectively competing with pyoverdine for metal chelation. The results further indicate that AA is more effective than DHA at inducing *femA* expression in  $\Delta pvd\Delta pchA$  or  $\Delta pvdF$  strains. While PCH also

induces *femA* expression, it is less effective than both AA and DHA in these strains, where pyoverdine-mediated iron competition is absent.

These observations suggest that *P. aeruginosa* utilizes AA and DHA to acquire iron in mutants incapable of producing pyoverdine, as these degradation products facilitate *femA*



expression and subsequent iron uptake. It is well established that pyoverdine production enhances the virulence of *P. aeruginosa* by promoting iron uptake given its higher affinity for iron compared to pyochelin. However, pyoverdine-deficient *P. aeruginosa* mutants have been isolated from cystic fibrosis lung infections.<sup>69–71</sup> Our data indicate that such mutants may exploit the degradation of PCH into DHA and AA as an alternative strategy to access iron. However, a key question remains whether AA and DHA have sufficient affinity for iron to effectively sequester it from the host. Similarly, in plant infection models involving wheat and *Arabidopsis*, pyoverdine-deficient *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae* strains exhibit reduced fitness but can remain infectious, depending on environmental iron availability.<sup>72</sup> In such systems, if pyoverdine production is impaired by mutation, then AA and DHA may contribute to iron acquisition, thereby compensating for the absence of pyoverdine.

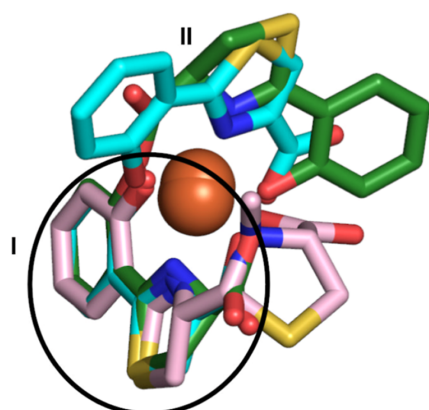
Moreover, this mechanism of iron acquisition through DHA and AA may also operate in wild-type PAO1 strains capable of producing both siderophores, pyoverdine and PCH, particularly under conditions of moderate iron deficiency. Indeed, we previously demonstrated that *P. aeruginosa* PAO1 produces significant amounts of both pyoverdine and PCH in highly iron-restricted medium, such as CAA, which contains 20 nM Fe.<sup>59</sup> In contrast, in a less iron-restricted medium, such as succinate medium containing around 320 nM Fe, *P. aeruginosa* reduces pyoverdine production while continuing to produce PCH.<sup>59</sup> Under such less iron-restricted conditions, PCH induces *femA* expression, and its degradation into AA or DHA further enhances *femA* expression, improving iron acquisition efficiency without requiring pyoverdine production, as demonstrated by using our fluorescent reporter approach.

The ability to utilize AA and DHA, degradation products of PCH, highlights a strategy by which *P. aeruginosa* maximizes the efficiency of PCH synthesis and utilization. When PCH itself is depleted, its breakdown products can still function as siderophores, maintaining iron acquisition. A similar phenomenon is observed in *Escherichia coli*, where the siderophore enterobactin and its degradation product, 2,3-dihydroxybenzoylserine (DHBS), serve as iron-chelating molecules.<sup>24</sup> Notably, *P. aeruginosa* can exploit enterobactin as a xenosiderophore using PfeA as the TBDT.<sup>73</sup> Similarly, DHBS chelates iron and is used by *P. aeruginosa*, though TBDT responsible for its uptake remains unidentified.

**X-ray Structures of FemA Loaded with AA<sub>2</sub>-Fe, DHA<sub>2</sub>-Fe, or PCH-Fe.** To better understand the binding interactions of Ferri-AA, Ferri-DHA, and Ferri-PCH with FemA, the structure of FemA in the absence of siderophores was solved to a resolution of 1.9 Å by molecular replacement using the structure of *Acinetobacter baumannii* ferri-preacinetobactin TBDT BauA (pdb code 6H7V), which has the closest sequence similarity<sup>74</sup> (Table S4). The asymmetric unit contains two highly similar monomers (Root-Mean-Square Deviation of 0.236 Å for 670 amino acids). FemA arbore the typical outer membrane TBDT fold with a 22 antiparallel strand  $\beta$ -barrel and a plug domain folded inside of the barrel (Figure 8A). The first 107 residues, including the TonB box, are flexible. Similar to BauA, the folding of the extracellular loops toward the outer edge of the  $\beta$ -barrel leaves the NL1-NL3 loops of the plug domain accessible, which are typically involved in siderophore binding. One molecule of polyethylene glycol or of detergent (C8E4) is bound near these loops.

Structures of FemA loaded with AA-Fe and DHA-Fe were obtained by cocrystallization. In both structures, iron is chelated by two siderophore molecules with an octahedral coordination involving the phenolate, the nitrogen of the thiazole/thiazoline, and the carboxylate of both molecules (Figures 8B,C and S24). The net negative charge of the siderophore-Fe complex is stabilized by the Arg334. Siderophore-Fe complexes binds inside the  $\beta$ -barrel in a pocket formed mainly by  $\beta$ -strands 7 to 9 and extracellular loops L3 and L11. The first molecule of AA or DHA is stabilized by two stacking interactions: Arg334 interacts with one face of the phenol and thiazole/thiazoline rings, while Gln417 stabilizes the other face, [Figures 9A(a)–B(a) and S25A,B]. The position of these key residues is maintained by H-bonds with Asp177 and Asn400 for Arg334 and Tyr394 for Gln417. The hydroxylate group of the phenolate makes a hydrogen bond with Asn400. The complex is also stabilized by van der Waals interactions with residues Trp206 of NL3 and Leu178 of NL1 and residues Tyr394, Thr396, Ala398, Phe460 of the  $\beta$ -barrel. The second molecule is more solvent-exposed and adopts a conformation different from those of the AA and DHA structures [Figures 9B(a),B(b) and 10]. In the FemA-AA<sub>2</sub>-Fe complex, it makes two hydrogen bonds with the two key residues Arg334 and Gln417 and few van der Waals interactions (Pro335, Leu337, Phe460, Tyr760) [Figure 9A(a)]. Interactions between the hydroxyl group of the phenol of one molecule with the carboxylate of the other molecule may play a role in the stabilization of the complex. In the FemA-DHA<sub>2</sub>-Fe complex structure, the second molecule is flipped by 180° with the carboxylate occupying the hydroxyl position and vice versa, as the result of which this molecule makes fewer interactions (one hydrogen bond with Gln417 and two hydrophobic interactions with Asn400 and Phe460) [Figure 9A(b)]. Residual densities at the end of the refinement suggest the second molecule might partially adopt an alternative conformation like AA in chain B confirming recognition by FemA is mainly driven by the first siderophore molecule of the complex (Figure S26A). There are no significant changes in the  $\beta$ -barrel or plug domain regions as a result of the ligand binding, but in the FemA-AA<sub>2</sub>-Fe structure, the N-terminal residues 104–107 are well-defined in the electron density map compared to the apo and FemA-DHA<sub>2</sub>-Fe structures, which could be linked to a beginning of rearrangement in this region involved in the TonB recognition upon binding.

PCH-Fe binds to the same site on FemA as AA<sub>2</sub>-Fe and DHA<sub>2</sub>-Fe. As previously observed with the structure of the PCH outer membrane receptor FptA,<sup>75</sup> PCH chelates iron with a 1:1 stoichiometry, despite the complex being prepared with a 2-fold excess of PCH (Figures 9A(c) and S24C). The nitrogen atoms of the thiazoline and thiazolidine rings and the oxygen atoms of the phenolate and carboxylate groups are involved in chelation. One acetylacetonate molecule, originating from the buffer, completes the coordination sphere. The binding mode of PCH-Fe in FemA differs from its binding to FptA in *P. aeruginosa*.<sup>75</sup> Unlike FptA, interactions with FemA are primarily driven by the recognition of the phenol and thiazoline groups, which occupy the same positions as the first molecules of AA and DHA [Figure 10 and 9A(c)]. The thiazolidine and carboxylate groups, which are more exposed to the solvent, are stabilized by a hydrogen bond with Gln417 and a hydrophobic interaction with Phe460 [Figure 9A(c),B-(c),B(c)]. On the contrary, binding of PCH in the FptA



**Figure 10.** Comparison of the binding mode of AA<sub>2</sub>-Fe, DHA<sub>2</sub>-Fe, and PCH-Fe. Structures have been superposed using coordinates of the protein residues. Only atoms of the siderophore have been displayed for more clarity. Carbon atoms of DHA, AA, and PCH are colored as green, cyan, and pink, respectively. Fe<sup>3+</sup> are represented as an orange sphere. The portion of the siderophores that superposes well (phenolate and thiazole or thiazoline rings) has been highlighted by a black circle. The two molecules of AA and DHA have been labeled I and II.

binding site is primarily driven by polar interactions and the carboxylate is stabilized by three hydrogen bonds with the loops of the plug domain (Figure S27).

Most of the key interactions observed in AA and DHA complexes are conserved, with the phenolate and thiazoline groups buried in the binding pocket. However, the surface of interaction of the PCH molecule with the protein is smaller compared to those of the two molecules of AA or DHA (846 Å<sup>2</sup> of the buried surface for DHA<sub>2</sub>, 834 Å<sup>2</sup> for AA<sub>2</sub>, and 498 Å<sup>2</sup> for PCH) [Table 2 and Figure 9B(c)]. Furthermore, PCH is unable to interact with the key Arg334 residue, unlike the second molecule of AA and DHA, and the overall charge of the ferric complex differs (1+ for Fe-PCH vs 1- for Fe-AA<sub>2</sub> and Fe-DHA<sub>2</sub>). As a consequence, the presence of a positively charged residue in the binding pocket of FemA could be seen as unfavorable for interactions with PCH and a more hydrophobic binding site, like FptA, could be more optimal. We postulate that, despite being able to bind to FemA in a manner similar to that of AA and DHA, PCH is not transported due to

its reduced interaction with key residues at the binding site, which might fail to initiate conformational changes needed for the transport. Additionally, the difference in the overall charge of the ferric complex could also affect transport of PCH inside the β-barrel, which could be facilitated by polar residues.

Due to issues with the protein stability and the solubility of the siderophore molecules, we were unable to determine accurate binding parameters by isothermal titration calorimetry (Figure S28). Interface analysis of the complexes using QtPISA<sup>76</sup> (Table 2) suggests that in addition of a reduction of polar interactions, the slightly more hydrophilic DHA and PCH molecules are more penalized by desolvation upon binding compared to AA. This is reflected in the low enthalpy observed during the titrations.

During refinement, the maps revealed the presence of a PCH stereoisomer at position C4' (neoPCH) (Figure S26C), which did not alter the recognition. NeoPCH is one of the minor PCH stereoisomers produced during the organic synthesis of the PCH.<sup>47,77</sup> NeoPCH was shown to be recognized and transported by FptA,<sup>47,77</sup> raising therefore the question of a potential uptake through FemA. NeoPCH was tested to determine whether, like PCH, it could transport iron via FemA and induce *femA* expression. The data clearly show that PCH and neoPCH behave similarly: like PCH, neoPCH was unable to import <sup>55</sup>Fe into *P. aeruginosa* cells via FemA but did induce *femA* expression (Figure S23).

These data collectively demonstrate that FemA binds the ferric forms of AA, DHA, and PCH, albeit through subtly different binding modes (Figures 9 and 10, Figure S29). For PCH, <sup>55</sup>Fe import data indicate that although PCH-Fe binds to the FemA binding site, it does not proceed to transport. The unique binding mechanisms of AA<sub>2</sub>-Fe and DHA<sub>2</sub>-Fe with FemA enable transport, unlike PCH-Fe. However, PCH-Fe binding still activates the signaling cascade via the anti-sigma and sigma factors FemI and FemR, leading to *femA* transcription, albeit less efficiently than with AA<sub>2</sub>-Fe and DHA<sub>2</sub>-Fe. These findings further suggest that binding of a siderophore-Fe complex to a TDBT binding site does not necessarily result in transport. The reason PCH-Fe is not transported through the outer membrane via FemA remains unclear, but it may be due to incomplete or partial conformational changes in the transporter required for import or to the inability of PCH to form some key polar interactions during transport.

**Table 2.** PISA Analysis of Interfaces<sup>76a</sup>

	AA			DHA			PCH	
	interfaces		assembly	interfaces		assembly	interface	assembly
	AA (I) /FemA	AA (II) /FemA	2AA-FemA	DHA (I) /FemA	DHA (II) /FemA	2DHA-FemA	PCH/FemA	PCH-FemA
interface area Å <sup>2</sup>	184	161	417	195	153	423	249	249
ligand buried surface area Å <sup>2</sup>	250 (69%)	201 (55%)		260 (69%)	177 (48%)		304 (66%)	
protein buried surface Å <sup>2</sup>	119 (0.5%)	122 (0.5%)		131 (0.5%)	129 (0.5%)		194 (0.7%)	
assembly buried surface Å <sup>2</sup>			834			846		498
Δ <sup>b</sup> G <sup>b</sup> (kcal/mol)	0.1	-0.7		6.1	2.2		1.0	
<i>P</i> -value <sup>c</sup>	-1.0	-1		0.138	0.0023		0.80595	
polar interactions	1	2	3	1	1	2	2	2
no. of residues involved	13	9	18	13	8	17	15	15

<sup>a</sup>Values reported are an average from chains A and B. Interactions between the two molecules of DHA or AA are not detailed in the table but included in the assembly analysis. <sup>b</sup>Δ<sup>b</sup>G, solvation energy gain upon formation of the interface. <sup>c</sup>*P*-value: probability to get a Δ<sup>b</sup>G lower.

## CONCLUSIONS

Our findings provide valuable new insights into the intricate iron acquisition strategies employed by *P. aeruginosa*, particularly under conditions of moderate iron deficiency. We demonstrate that PCH degrades in solution to form AA as the final oxidation product and that the presence of AA and DHA in bacterial growth media induces the transcription and expression of *femA*. This gene encodes the transporter FemA, previously characterized as the TBDT for ferri-MYC. While FptA selectively imports ferri-PCH, FemA is responsible for importing ferri-AA and ferri-DHA, showcasing distinct siderophore-transporter pairings.

Structural analysis of FemA bound to ferri-AA, ferri-DHA, and ferri-PCH reveals similar binding interactions, yet only ferri-AA and ferri-DHA are transported. This indicates that the binding mode involves highly precise interactions to trigger the uptake process. Structural studies we reported show that PCH binding is similar to AA and DHA to some extent, with the phenolate and thiazoline groups forming the same interactions as the first molecule of AA and DHA. However, we postulate that slight differences in PCH binding interactions (surface of interaction with the protein, lack of interaction with the key residue Arg334) and the difference in the overall charge of the ferric complex (PCH-Fe vs AA<sub>2</sub>-Fe and DHA<sub>2</sub>-Fe) might affect the transport. This could occur either by failing to initiate the conformational changes necessary for transport or by being unable to interact with polar residues inside the  $\beta$ -barrel during the transport process.

Nonetheless, all three complexes induce *femA* expression. Importantly, AA and DHA can induce *femA* expression only in strains lacking pyoverdine production. This is due to their lower affinity for iron, which prevents them from effectively competing with pyoverdine for metal chelation. Under moderate iron limitation—when PCH is produced but pyoverdine is absent<sup>59</sup>—*femA* expression is upregulated by PCH and its degradation products, AA or DHA. This enables iron uptake through these compounds, enhancing overall iron acquisition efficiency.

This adaptive mechanism parallels strategies observed in other bacteria such as *E. coli* with enterobactin, where siderophore degradation products are repurposed to optimize iron acquisition. Furthermore, our results suggest that binding of a siderophore-iron complex to a TBDT does not always result in transport. For instance, while FemA binds the ferri-PCH complex, transport does not occur, possibly due to incomplete conformational changes in the transporter.

Overall, these findings deepen our understanding of siderophore transport specificity and regulation, shedding light on how *P. aeruginosa* tailors its iron uptake systems to adapt to varying environmental iron conditions.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** The protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was obtained from Sigma-Aldrich, the FeCl<sub>3</sub> was purchased from VWR, and <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub> was sourced from PerkinElmer. Synthesis of AA and DHA are described in the [Supporting Information](#). PCH and neoPCH were synthesized using previously published protocols.<sup>47</sup>

**Bacterial Strains, Plasmids, and Growth Conditions.** The *P. aeruginosa* strains utilized in this investigation are delineated in [Table S1](#) in the Supporting Information. The iron-deficient CAA medium employed comprises 5 g L<sup>-1</sup> low-iron CAA (Difco), 1.46 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, and 0.25 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O.

**Plasmid and Strain Construction.** Enzymes were procured from ThermoFisher Scientific. Plasmid construction and mutagenesis in the chromosomal genome of *P. aeruginosa* were executed as previously outlined<sup>41</sup> and the nucleotides used are described in [Table S2](#). In essence, the blunt-end ligation strategy was employed to integrate 1400 bp flanking sequences of the genes *femA* and *fptA* for the deletion mutants into the suicide vector pEXG2. For the fluorescent reporters PAO1-*P<sub>femA</sub>*-*ypet*,  $\Delta$ *pvdF*-*P<sub>femA</sub>*-*ypet* and  $\Delta$ *pvdF* $\Delta$ *pchA*-*P<sub>femA</sub>*-*ypet*, the plasmid pEXG2 *P<sub>femA</sub>*-*ypet* was constructed as previously described.<sup>42</sup> The resultant plasmids, following sequencing, were utilized to introduce chromosomal mutations into the *P. aeruginosa* PAO1,  $\Delta$ *pvdF*, and  $\Delta$ *pvdF* $\Delta$ *pchA* strains. The insertion of the *P<sub>femA</sub>*-*ypet* sequence was executed in the intergenic region between *gims* and *PAS548* genes as described previously.<sup>42</sup> All generated mutants were corroborated via PCR and sequencing.

**Mass Spectrometry Metabolic Profiling.** Mass spectrometry profiling was performed on UHPLC ThermoFisher Ultimate3000 with a Scientific Vanquish Flex. Detector: Vanquish PDA (VF-XX). ThermoFisher Orbitrap EMR series: Exactive Plus with an Extended Mass Range: Source HESI II. Thermo Fisher RP-MS: 150 × 2.1 mm, 1.9 mm. Mobile phase are A(H<sub>2</sub>O) and B(acetonitrile) both with 0.1% Formic acid. 2.5  $\mu$ L was injected by sample followed with a control (CAA) and a blank of MeOH (same solvent used for sample preparation) with the following chromatographic conditions: (1) 0 to 0.5 min starting conditions: 2% B. (2) 0.5 to 9 min: 2% to 100%. (3) 9 to 11 min: 100% B. (4) 11–11.5 min back to starting conditions. Processing: the specific targeted compound was followed by an extracted-ion chromatogram using Xcalibur Qual browser software (ThermoFisher Scientific).

*P. aeruginosa*  $\Delta$ *pvdF* $\Delta$ *pchA* cells were initially grown in 5 mL of LB followed by an overnight culture in CAA medium at 30 °C. Bacteria were pelleted, diluted in CAA medium to an OD<sub>600 nm</sub> of 0.1, and grown for 15 h in the absence or presence of 10  $\mu$ M PCH at 30 °C. Subsequently, bacteria were pelleted to collect the supernatant. The supernatant was filtered using a 0.22  $\mu$ m membrane, acidified, and extracted using dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under vacuum. The resulting samples were dissolved with 1 mL of MeOH LC/MS grade, and a volume of 2.5 mL was injected for metabolic profiling. The qualitative analysis of a group of related compounds was performed by monitoring positive and negative extracted-ion chromatogram, see [Figures S7–S16](#). Each targeted ion was extracted with a maximum variation of 0.04 atomic mass unit (amu). The extracted-ion chromatogram was therefore enough to determine the presence or absence of a specific compound, specifically for PCH, DHA, AA 5, AAlD, and DHAld, see [Table 1](#). To assume the presence or absence of targeted ion, a theoretical fitting was achieved with the experimental monoisotopic pattern at the resolution given by the mass spectrometer.

**Proteomic Analysis.** *P. aeruginosa*  $\Delta$ *pvdF* $\Delta$ *pchA* cells were initially cultured overnight in LB followed by a culture in CAA medium. Subsequently, bacteria were pelleted, diluted in CAA medium to an OD<sub>600 nm</sub> of 0.1, and grown for 8 h with or without 10  $\mu$ M PCH, DHA or AA at 30 °C. Cell harvest involved 5 × 10<sup>8</sup> cells, and a biological triplicate was prepared for each sample under each cell-culture condition. Cell pellets were resuspended in 200  $\mu$ L of lysis buffer (UTCT buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, and 20 mM Tris-HCl pH 7.6) supplemented with nuclease and DNase. Protein concentrations were determined using the Bradford assay with bovine serum albumin as the standard. Proteins were subsequently precipitated overnight with glacial 0.1 M ammonium acetate in 100% methanol (5 volumes, -20 °C). After centrifugation at 12,000g and 4 °C for 15 min, the resulting pellets were washed twice with 0.1 M ammonium acetate in 80% methanol and further dried under vacuum (Speed-Vac concentrator). Pellets were resuspended in 100  $\mu$ L of 50 mM ammonium bicarbonate and subjected to reduction (5 mM dithiothreitol, 95 °C, 10 min) and alkylation (10 mM iodoacetamide, RT, 20 min). Proteins were finally digested overnight with 150 ng of sequencing-grade trypsin (Promega).

Proteomic data sets were obtained by injecting 1000 ng of each peptide mixture into a TripleTOF 5600 mass spectrometer (Sciex) coupled to a U3000-RSLC liquid chromatograph (Thermo-Fisher Scientific), as described previously. For each differential proteomic analysis, data were searched against the *P. aeruginosa* UniprotKB database (UniprotKB release 2020\_05, taxon 208964, *P. aeruginosa* strain PAO1, 5564 forward protein sequences). Peptides and proteins were identified using the Mascot algorithm (version 2.8, Matrix Science, London, UK). The following parameters were used: (i) Trypsin/P was selected as the enzyme, (ii) two missed cleavages were allowed, (iii) methionine oxidation and acetylation of the protein N-terminus were set as variable modifications and carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification, and (iv) mass tolerance for precursor ions was set to 20 ppm and 0.5 Da for fragment ions. Mascot data were then imported into Proline software v2.0.<sup>78</sup> Proteins were validated against a Mascot pretty rank equal to 1 and a 1% FDR for both peptide spectrum matches (PSM score) and protein sets (Protein Set score).

All MS/MS fragmentation spectra were used to quantify each protein from at least three independent biological replicates. After a total number of spectra normalization of the data matrix, the "BasicSC" spectral counts were subjected to a negative-binomial test using edgeR GLM regression of R (R v3.2.5) through the IPInquiry package.<sup>79</sup> The statistical test was based on the published msmsTests R package available in Bioconductor to process label-free LC-MS/MS data by spectral counts.<sup>80</sup> For each identified protein, an adjusted *P*-value (adjp), corrected by the Benjamini–Hochberg procedure, was calculated as well as the protein fold-change (FC).

The MS data were deposited in the ProteomeXchange Consortium database via the PRIDE<sup>81</sup> partner repository with the data set identifier PXD058246.

**Quantitative Real-Time PCR.** The transcription of specific genes of interest was assessed using quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR), following previously described methods.<sup>41,57</sup> Cultures were conducted identically with those used for the proteomic analyses. After 8 h of culture,  $2.5 \times 10^8$  cells were harvested, and two volumes of RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) were added. Total RNA was isolated from the pellet using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Subsequently, 1  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed using an RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems). Specific cDNA in our samples was quantified using a StrepOne Plus instrument (Applied Biosystems), along with the appropriate primers (Table S3), and the Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The transcript level for each gene was normalized against those of *urrD* and expressed as a log<sub>2</sub> ratio (fold-change) relative to the reference condition.

**Growth Assays under Iron-Restricted Conditions.** For *P. aeruginosa* growth assays in microplates under iron-restricted conditions, bacteria ( $\Delta$ *pvdF* $\Delta$ *pchA* and its corresponding *jptA* and *femA* mutants as well as the fluorescent reporters PAO1-*P<sub>femA</sub>*-*ypet*,  $\Delta$ *pvdF*-*P<sub>femA</sub>*-*ypet*, and  $\Delta$ *pvdF* $\Delta$ *pchA*-*P<sub>femA</sub>*-*ypet*) were cultured initially overnight at 30 °C in 5 mL of LB broth, followed by bacterial washing and a second overnight culture in 10 mL of CAA medium at 30 °C. Subsequently, bacteria were washed, resuspended in CAA medium to an optical density of 0.01 at 600 nm, and dispensed into a 96-well plate (Greiner, U-bottom microplate) in the presence or absence of 10  $\mu$ M PCH, DHA, AA, or of increasing concentrations of PCH (0–800  $\mu$ M), DHA (0–1000  $\mu$ M), AA (0–2000  $\mu$ M) or neoPCH (0–800  $\mu$ M). Plates were then incubated at 30 °C with shaking in a TECAN microplate reader (Infinite M200, Tecan) and the bacterial growth (OD at 600 nm) was monitored every 30 min, for 24 h. For the experiments with the fluorescent reporters, YPet fluorescence (excitation at 500 nm and emission at 540 nm) and the bacterial growth (OD at 600 nm) were monitored every 30 min, for 24 h.

**Iron Uptake.** The PCH-<sup>55</sup>Fe and neo-PCH-<sup>55</sup>Fe complexes were prepared at <sup>55</sup>Fe concentrations of 50  $\mu$ M, with a chelator/iron (mol/mol) ratio of 20:1, following established protocols.<sup>82,83</sup> *P. aeruginosa* strains were sequentially cultured overnight in LB broth, followed by overnight growth in CAA medium, and finally, overnight growth in CAA medium supplemented with either 10  $\mu$ M PCH or 100  $\mu$ M

neoPCH at 30 °C. The bacteria were subsequently utilized to investigate <sup>55</sup>Fe uptake kinetics, as previously described, in the presence or absence of 200  $\mu$ M CCCP (a proton motive force inhibitor) at a concentration of chelator-<sup>55</sup>Fe complexes of 500 nM.<sup>82,83</sup>

**Cloning and Overexpression of FemA in *E. coli* and Purification for the Structural Biology.** The coding sequence of the mature protein FemA (uniprot Q9I2J4) was amplified using the primers 5'-GTCATGACCCCCGCCCTGCTTGCC and 5'-GGATCCTCAGAAGTCCGCCGTGAGGGAAA and Q5 DNA polymerase. PCR product has been digested by BspHI and BamHI restriction enzymes and inserted in pTAMAHISTEV vector using NcoI and BamHI restriction sites generating a construct with an N-terminal tobacco etch virus (TEV) protease cleavable His7-tag.

The protein was overexpressed in *E. coli* C43 (DE3) cells. Cells were grown at 37 °C in LB medium containing 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> ampicillin until an OD<sub>600 nm</sub> of 0.7 and then induced with 0.4 mM IPTG at 25 °C overnight. The proteins were purified following the protocol used for PfeA described in Moynié et al.<sup>24</sup> Isolated outer-membrane pellets were solubilized with 7% octylpolyoxyethylene (octylPOE) and the proteins were purified with a Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatograph followed by the His-tag cleavage by TEV protease and a second IMAC column. Finally, the protein was loaded on a Superdex S200 gel filtration chromatograph (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.45% C8E4) and concentrated to 16 mg.mL<sup>-1</sup>.

**Crystallization and Structure Determination.** Apo crystals of FemA appeared at 20 °C after a few days by mixing 200 nL of protein solution (16 mg.mL<sup>-1</sup>) with 100 nL of reservoir solution containing 29% PEG 400, 0.05 M calcium acetate, pH 5, and 0.1 M sodium Chloride. FemA-AA-Fe and FemA-DHA-Fe complex structures were obtained by adding 1 mM siderophore-Fe with a stoichiometry of 2:1 (siderophore/Fe<sup>3+</sup>) to the protein solution (16 mg.mL<sup>-1</sup>) prior to setting up the plates. Crystals appeared with a reservoir solution containing 33% PEG 400, 0.1 M Hepes pH 7.5 and 22% PEG 4000, 0.1 M MES pH 6, 0.1 M magnesium acetate, respectively. The complex structure with PCH has been obtained by soaking crystals with a solution freshly prepared of 2 mM Fe<sup>3+</sup>-acetylacetonate PCH in a 1:2 ratio (Fe<sup>3+</sup>: siderophore) for few minutes with the mother liquor containing 26% PEG 400 before freezing.

Data were collected at beamlines I24 and I04 at Diamond Light Source. Data were processed with xia2.<sup>84–86</sup> The apo structure has been solved by molecular replacement using coordinates of the *A. baumannii* preacinobactin TBdT (6H7 V). Structures of the complexes have been solved using the apo structure, models were adjusted with COOT,<sup>87</sup> and refinement was carried out using Phenix<sup>88</sup> or REFMAC5<sup>89</sup> and topologies of ligands were generated by AceDRG.<sup>90</sup> Final refinement statistics are listed in Table S4. Atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (8S34, 9EX3, 9F2T, 9FVQ). Figures were drawn using PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.5 Schrödinger, LLC and CCP4MG version 2.11.0.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acschembio.4c00820>.

Synthesis protocols and spectral characterization (including <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra and HRMS) of compounds 3 and AA; UV total scans, total and extracted -ion chromatogram (positive and negative mode) used for mass spectrometry metabolic profiling; additional figures in microbiology and structural biology; lists of *P. aeruginosa* strains and of primers used for this study; And crystallographic data and refinement statistics concerning FemA structures (PDF)



## AUTHOR INFORMATION

## Corresponding Authors

Lucile Moynié – The Rosalind Franklin Institute, Oxfordshire OX11 0QS, United Kingdom; Email: Lucile.Moynie@rfi.ac.uk

Isabelle J. Schalk – CNRS, University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France; University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France; [orcid.org/0000-0002-8351-1679](https://orcid.org/0000-0002-8351-1679); Email: isabelle.schalk@unistra.fr

## Authors

Virginie Will – CNRS, University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France; University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France

Elise Si Ahmed Charrier – CNRS, University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France; University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France

Audrey Le Bas – The Rosalind Franklin Institute, Oxfordshire OX11 0QS, United Kingdom

Lauriane Kuhn – Plateforme Protéomique Strasbourg-Esplanade, CNRS, Université de Strasbourg, IBM, F-67084 Strasbourg, France

Florian Volck – CNRS, University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France; University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France

Johana Chicher – Plateforme Protéomique Strasbourg-Esplanade, CNRS, Université de Strasbourg, IBM, F-67084 Strasbourg, France

Hava Aksoy – Université de Strasbourg, Institut des Sciences et de L'Ingénierie Supramoléculaire, F-67000 Strasbourg, France

Morgan Madec – ICube Laboratory, UMR 7357 (CNRS/University of Strasbourg), F-67412 Strasbourg, Illkirch, France

Cyril Antheaume – Université de Strasbourg, Institut des Sciences et de L'Ingénierie Supramoléculaire, F-67000 Strasbourg, France

Gaëtan L. A. Mislin – CNRS, University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France; University of Strasbourg, F-67412 Strasbourg, Illkirch, France

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acschembio.4c00820>

## Author Contributions

¶V.W. and L.M. contributed equally. IJS, GLAM, and LM wrote the manuscript with input from the other authors. IJS supervised biology experiments, GLAM supervised chemistry experiments, CA supervised the mass spectrometry studies, MM supervised modelization of the fluorescent data and LM supervised structural biology. GLAM synthesized PCH and neoPCH, EC synthesized AA and DHA. HA performed the mass spectrometry analysis. VW did microbiology experiments and radioactive iron uptake assays, LK and JC performed and analyzed the proteomic experiments, FV performed with VW the modelization of the fluorescent data. ALB and LM performed all the structural biology. IJS and GLAM found the grants.

## Funding

IJS and GLAM warmly thank Vaincre la Mucoviscidose and the Association Grégory Lemarchal (French associations against cystic fibrosis) for repeated financial support. IJS and GLAM also acknowledge the Interdisciplinary Thematic

Institute (ITI) InnoVec (Innovative Vectorization of Biomolecules, IdEx, ANR-10-IDEX-0002), the SFRI (ANR-20-SFRI-0012), and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for financial support and for the Master fellowship of EC. The presented work was also supported by a grant from the CNRS (80/Prime 2020) as well as by two grants from the Agence Nationale de la Recherche (IRUPP, ANR-22-CE44-0024-01, and VECTRIUM project, ANR 19-CE18-0011-02). VW acknowledges the Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies for providing a PhD fellowship. CA acknowledges CNRS and the Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaire (ISIS) for providing a Master Degree fellowship for HA. The Rosalind Franklin Institute is funded by UK Research and Innovation through the Engineering and Physical Sciences Research Council. We would like to thank the Membrane Protein Laboratory at Diamond Light Source (funded by Wellcome Trust grant 223727/Z/21/Z) for help and support.

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## REFERENCES

- (1) Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S. Enterobactin: An Archetype for Microbial Iron Transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100* (7), 3584–3588.
- (2) Krewulak, K. D.; Vogel, H. J. Structural Biology of Bacterial Iron Uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778* (9), 1781–1804.
- (3) Schalk, I. J.; Perraud, Q. *Pseudomonas aeruginosa* and Its Multiple Strategies to Access Iron. *Environ. Microbiol.* **2023**, *25* (4), 811–831.
- (4) Schalk, I. J. Bacterial Siderophores: Diversity, Uptake Pathways and Applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2025**, *23*, 24–40.
- (5) Boukhalfa, H.; Crumbliss, A. L. Chemical Aspects of Siderophore Mediated Iron Transport. *BioMetals* **2002**, *15* (4), 325–339.
- (6) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and Biology of Siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (5), 637–657.
- (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.* **2012**, *69*, 37–66.
- (8) Celia, H.; Noinaj, N.; Zakharov, S. D.; Bordignon, E.; Botos, I.; Santamaria, M.; Barnard, T. J.; Cramer, W. A.; Lloubes, R.; Buchanan, S. K. Structural Insight into the Role of the Ton Complex in Energy Transduction. *Nature* **2016**, *538* (7623), 60–65.
- (9) Celia, H.; Botos, I.; Ni, X.; Fox, T.; De Val, N.; Lloubes, R.; Jiang, J.; Buchanan, S. K. Cryo-EM Structure of the Bacterial Ton Motor Subcomplex ExbB-ExbD Provides Information on Structure and Stoichiometry. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 358.
- (10) Celia, H.; Noinaj, N.; Buchanan, S. K. Structure and Stoichiometry of the Ton Molecular Motor. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (2), 375.
- (11) Will, V.; Gasser, V.; Kuhn, L.; Fritsch, S.; Heinrichs, D. E.; Schalk, I. J. Siderophore Specificities of the *Pseudomonas aeruginosa* TonB-Dependent Transporters ChtA and ActA. *FEBS Lett.* **2023**, *597* (23), 2963–2974.
- (12) Will, V.; Frey, C.; Normant, V.; Kuhn, L.; Chicher, J.; Volck, F.; Schalk, I. J. The Role of FoxA, FiuA, and FpvB in Iron Acquisition via Hydroxamate-Type Siderophores in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **2024**, *14* (1), 18795.
- (13) Schalk, I. J.; Guillon, L. Fate of Ferrisiderophores after Import across Bacterial Outer Membranes: Different Iron Release Strategies Are Observed in the Cytoplasm or Periplasm Depending on the Siderophore Pathways. *Amino Acids* **2013**, *44* (5), 1267–1277.
- (14) Cox, C. D. Effect of Pyochelin on the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **1982**, *36*, 17–23.
- (15) Demange, P.; Wendenbaum, S.; Linget, C.; Mertz, C.; Cung, M. T.; Dell, A.; Abdallah, M. A. Bacterial Siderophores: Structure and

- NMR Assignment of Pyoverdins PaA, Siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol. Met.* **1990**, *3*, 155–170.
- (16) Schalk, I. J.; Rigouin, C.; Godet, J. An Overview of Siderophore Biosynthesis among Fluorescent Pseudomonads and New Insights into Their Complex Cellular Organization. *Environ. Microbiol.* **2020**, *22* (4), 1447–1466.
- (17) Cornelis, P.; Bodilis, J. A Survey of TonB-Dependent Receptors in Fluorescent Pseudomonads. *Environ. Microbiol. Rep.* **2009**, *1* (4), 256–262.
- (18) Ankenbauer, R. G.; Quan, H. N. FptA, the Fe(III)-Pyochelin Receptor of *Pseudomonas aeruginosa*: A Phenolate Siderophore Receptor Homologous to Hydroxamate Siderophore Receptors. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (2), 307–319.
- (19) Cobessi, D.; Celia, H.; Pattus, F. Crystallization and X-Ray Diffraction Analyses of the Outer Membrane Pyochelin Receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (10), 1919–1921.
- (20) Poole, K.; Neshat, S.; Krebs, K.; Heinrichs, D. E. Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the Ferripyoverdine Receptor Gene *fvpA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (15), 4597–4604.
- (21) Ghysels, B.; Dieu, B. T.; Beatson, S. A.; Pirnay, J. P.; Ochsner, U. A.; Vasil, M. L.; Cornelis, P. FpvB, an Alternative Type I Ferripyoverdine Receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2004**, *150* (6), 1671–1680.
- (22) Cobessi, D.; Célia, H.; Folschweiller, N.; Schalk, I. J.; Abdallah, M. A.; Pattus, F. The Crystal Structure of the Pyoverdine Outer Membrane Receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **2005**, *347*, 121–134.
- (23) Dean, C. R.; Poole, K. Cloning and Characterization of the Ferric Enterobactin Receptor Gene (*pfeA*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (2), 317–324.
- (24) 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. The Complex of Ferric-Enterobactin with Its Transporter from *Pseudomonas aeruginosa* Suggests a Two-Site Model. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 3673.
- (25) Elias, S.; Degtyar, E.; Banin, E. FvbA Is Required for Vibriobactin Utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2011**, *157* (7), 2172–2180.
- (26) Ghysels, B.; Ochsner, U.; Mollman, U.; Heinisch, L.; Vasil, M.; Cornelis, P.; Matthijs, S. The *Pseudomonas aeruginosa* *pirA* Gene Encodes a Second Receptor for Ferrienterobactin and Synthetic Catecholate Analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *246* (2), 167–174.
- (27) Moynié, L.; Luscher, A.; Rolo, D.; Pletzer, D.; Tortajada, A.; Weingart, H.; Braun, Y.; Page, M. G. P.; Naismith, J. H.; Köhler, T. Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (4), No. e02531-16.
- (28) Perraud, Q.; Kuhn, L.; Fritsch, S.; Graulier, G.; Gasser, V.; Normant, V.; Hammann, P.; Schalk, I. J. Opportunistic Use of Catecholamine Neurotransmitters as Siderophores to Access Iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **2022**, *24* (2), 878–893.
- (29) Luscher, A.; Gasser, V.; Bumann, D.; Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J.; Köhler, T. Plant-Derived Catechols Are Substrates of TonB-Dependent Transporters and Sensitize *Pseudomonas aeruginosa* to Siderophore-Drug Conjugates. *mBio* **2022**, *13*, No. e0149822.
- (30) Hannauer, M.; Barda, Y.; Mislin, G. L.; Shanzer, A.; Schalk, I. J. The Ferrichrome Uptake Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and a Recycling of the Modified Desferrichrome. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 1212–1220.
- (31) 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* **2019**, *8*, No. e48528.
- (32) Normant, V.; Josts, I.; Kuhn, L.; Perraud, Q.; Fritsch, S.; Hammann, P.; Mislin, G. L. A.; Tidow, H.; Schalk, I. J. Nocardamine-Dependent Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Exclusive Involvement of the FoxA Outer Membrane Transporter. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15* (10), 2741–2751.
- (33) Chan, D. C. K.; Burrows, L. L. Thiocillin and Micrococcin Exploit the Ferrioxamine Receptor of *Pseudomonas aeruginosa* for Uptake. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76* (8), 2029–2039.
- (34) Cui, P. O.; Clarke, P.; O'Connell, M. Identification and Characterization of an Iron-Regulated Gene, *chtA*, Required for the Utilization of the Xenosiderophores Aerobactin, Rhizobactin 1021 and Schizokinen by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2006**, *152* (4), 945–954.
- (35) Llamas, M. A.; Mooij, M. J.; Sparrius, M.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.; Ratledge, C.; Bitter, W. Characterization of Five Novel *Pseudomonas aeruginosa* Cell-Surface Signalling Systems. *Mol. Microbiol.* **2008**, *67* (2), 458–472.
- (36) Chan, D. C. K.; Burrows, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* FpvB Is a High-Affinity Transporter for Xenosiderophores Ferrichrome and Ferrioxamine B. *mBio* **2023**, *14* (1), No. e0314922.
- (37) Dean, C. R.; Neshat, S.; Poole, K. PfeR, an Enterobactin-Responsive Activator of Ferric Enterobactin Receptor Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1996**, *178* (18), 5361–5369.
- (38) 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.* **2005**, *58* (2), 495–509.
- (39) Llamas, M. A.; Imperi, F.; Visca, P.; Lamont, I. L. Cell-Surface Signaling in *Pseudomonas*: Stress Responses, Iron Transport, and Pathogenicity. *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, *38* (4), 569–597.
- (40) Edgar, R. J.; Xu, X.; Shirley, M.; Konings, A. F.; Martin, L. W.; Ackerley, D. F.; Lamont, I. L. Interactions between an Anti-Sigma Protein and Two Sigma Factors That Regulate the Pyoverdine Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 287.
- (41) 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. Phenotypic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Mol. Cell. Proteomics* **2020**, *19* (4), 589–607.
- (42) Hubert, T.; Madec, M.; Schalk, I. J. Experimental and Computational Methods to Highlight Behavioural Variations in TonB-Dependent Transporter Expression in *Pseudomonas aeruginosa* versus Siderophore Concentration. *Sci. Rep.* **2023**, *13* (1), 20015.
- (43) Maspoli, A.; Wenner, N.; Mislin, G. L. A.; Reimmann, C. Functional Analysis of Pyochelin-/Enantiopyochelin-Related Genes from a Pathogenicity Island of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA14. *BioMetals* **2014**, *27* (3), 559–573.
- (44) Kaplan, A. R.; Musaev, D. G.; Wuest, W. M. Pyochelin Biosynthetic Metabolites Bind Iron and Promote Growth in Pseudomonads Demonstrating Siderophore-like Activity. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (3), 544–551.
- (45) Kaplan, A. R.; Wuest, W. M. Promiscuous *Pseudomonas*: Uptake of Non-Endogenous Ligands for Iron Acquisition. *Tetrahedron Lett.* **2021**, *75*, 153204.
- (46) Patel, H. M.; Walsh, C. T. In Vitro Reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* Nonribosomal Peptide Synthesis of Pyochelin: Characterization of Backbone Tailoring Thiazoline Reductase and N-Methyltransferase Activities. *Biochemistry* **2001**, *40* (30), 9023–9031.
- (47) Zamri, A.; Abdallah, M. A. An Improved Stereocontrolled Synthesis of Pyochelin, a Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 249–256.
- (48) Youard, Z. A.; Mislin, G. L.; Majcherczyk, P. A.; Schalk, I. J.; Reimmann, C. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 Produces Enantiopyochelin, the Optical Antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* Siderophore Pyochelin. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (49), 35546–35553.
- (49) Schlegel, K.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H. The Stereoisomers of Pyochelin, a Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMetals* **2004**, *17* (4), 409–414.

- (50) Hayen, H.; Volmer, D. A. Different Iron-Chelating Properties of Pyochelin Diastereoisomers Revealed by LC/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385* (3), 606–611.
- (51) Ye, L.; Cornelis, P.; Guillemyn, K.; Ballet, S.; Christophersen, C.; Hammerich, O. Structure Revision of N-Mercapto-4-Formylcarboxystyryl Produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-Hydroxyphenyl)Thiazole-4-Carbaldehyde [Aeruginaldehyde]. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9* (6), 789–794.
- (52) Cornelis, P. Putting an End to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS Controversy. *Microbiologyopen* **2020**, *9* (2), No. e962.
- (53) Trottmann, F.; Franke, J.; Ishida, K.; García-Altres, M.; Hertweck, C. A Pair of Bacterial Siderophores Releases and Traps an Intercellular Signal Molecule: An Unusual Case of Natural Nitrore Bioconjugation. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2019**, *58* (1), 200–204.
- (54) Huang, Y.; Gan, H.; Li, S.; Xu, J.; Wu, X.; Yao, H. Oxidation of 4-Carboxylate Thiazolines to 4-Carboxylate Thiazoles by Molecular Oxygen. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (13), 1751–1753.
- (55) McNesby, J. R.; Heller, C. A. Oxidation of Liquid Aldehydes by Molecular Oxygen. *Chem. Rev.* **1954**, *54* (2), 325–346.
- (56) Llamas, M. A.; Sparrius, M.; Kloet, R.; Jimenez, C. R.; Vandembroucke-Grauls, C.; Bitter, W. The Heterologous Siderophores Ferrioxamine B and Ferrichrome Activate Signaling Pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (5), 1882–1891.
- (57) 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. Catechol Siderophores Repress the Pyochelin Pathway and Activate the Enterobactin Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*: An Opportunity for Siderophore-Antibiotic Conjugates Development. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18* (3), 819–832.
- (58) Gasser, V.; Kuhn, L.; Hubert, T.; Aussel, L.; Hammann, P.; Schalk, I. J. The Esterase PfeE, the Achilles' Heel in the Battle for Iron between *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (6), 2814.
- (59) Cunrath, O.; Geoffroy, V. A.; Schalk, I. J. Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: A Role for Siderophores. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18* (10), 3258–3267.
- (60) Normant, V.; Kuhn, L.; Munier, M.; Hammann, P.; Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J. How the Presence of Hemin Affects the Expression of the Different Iron Uptake Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* Cells. *ACS Infect. Dis.* **2022**, *8*, 183.
- (61) Fritsch, S.; Gasser, V.; Peukert, C.; Pinkert, L.; Kuhn, L.; Perraud, Q.; Normant, V.; Brönstrup, M.; Schalk, I. J. Uptake Mechanisms and Regulatory Responses to MECAM- and DOTAM-Based Artificial Siderophores and Their Antibiotic Conjugates in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **2022**, *8* (6), 1134–1146.
- (62) 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. The Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* Optimizes the Production of the Siderophore Pyochelin upon Environmental Challenges. *Metallomics* **2020**, *12* (12), 2108–2120.
- (63) Bagg, A.; Neilands, J. B. Ferric Uptake Regulation Protein Acts as a Repressor, Employing Iron (II) as a Cofactor to Bind the Operator of an Iron Transport Operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **1987**, *26* (17), 5471–5477.
- (64) Coy, M.; Neilands, J. B. Structural Dynamics and Functional Domains of the Fur Protein. *Biochemistry* **1991**, *30* (33), 8201–8210.
- (65) Barton, H. A.; Johnson, Z.; Cox, C. D.; Vasil, A. I.; Vasil, M. L. Ferric Uptake Regulator Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with Distinct Alterations in the Iron-Dependent Repression of Exotoxin A and Siderophores in Aerobic and Microaerobic Environments. *Mol. Microbiol.* **1996**, *21* (5), 1001–1017.
- (66) Fillat, M. F. The FUR (Ferric Uptake Regulator) Superfamily: Diversity and Versatility of Key Transcriptional Regulators. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *546*, 41–52.
- (67) Albrecht-Gary, A. M.; Blanc, S.; Rochel, N.; Ocaktan, A. Z.; Abdallah, M. A. Bacterial Iron Transport: Coordination Properties of Pyoverdine PaA, a Peptidic Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 6391–6402.
- (68) Brandel, J.; Humbert, N.; Elhabiri, M.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A.; Albrecht-Gary, A. M. Pyochelin, a Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical Characterization of the Iron(III), Copper(II) and Zinc(II) Complexes. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (9), 2820–2834.
- (69) Nguyen, A. T.; O'Neill, M. J.; Watts, A. M.; Robson, C. L.; Lamont, I. L.; Wilks, A.; Oglesby-Sherrouse, A. G. Adaptation of Iron Homeostasis Pathways by a *Pseudomonas aeruginosa* Pyoverdine Mutant in the Cystic Fibrosis Lung. *J. Bacteriol.* **2014**, *196* (12), 2265–2276.
- (70) Takase, H.; Nitani, H.; Hoshino, K.; Otani, T. Impact of Siderophore Production on *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Immunosuppressed Mice. *Infect. Immun.* **2000**, *68* (4), 1834–1839.
- (71) Minandri, F.; Imperi, F.; Frangipani, E.; Bonchi, C.; Visaggio, D.; Facchini, M.; Pasquali, P.; Bragonzi, A.; Visca, P. Role of Iron Uptake Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Airway Infection. *Infect. Immun.* **2016**, *84* (8), 2324–2335.
- (72) Trapet, P.; Avoscan, L.; Klinguer, A.; Pateyron, S.; Citerne, S.; Chervin, C.; Mazurier, S.; Lemanceau, P.; Wendehenne, D.; Besson-Bard, A. The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens *Arabidopsis thaliana* Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions. *Plant Physiol.* **2016**, *171* (1), 675–693.
- (73) Perraud, Q.; Moynié, L.; Gasser, V.; Munier, M.; Godet, J.; Hoegy, F.; Mély, Y.; Mislin, G. L. A.; Naismith, J. H.; Schalk, I. J. A Key Role for the Periplasmic PfeE Esterase in Iron Acquisition via the Siderophore Enterobactin in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (9), 2603–2614.
- (74) Moynié, L.; Serra, I.; Scorciapino, M. A.; Oueis, E.; Page, M. G.; Ceccarelli, M.; Naismith, J. H. Preacinetobactin Not Acinetobactin Is Essential for Iron Uptake by the BauA Transporter of the Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Elife* **2018**, *7*, No. e42270.
- (75) Cobessi, D.; Celia, H.; Pattus, F. Crystal Structure at High Resolution of Ferric-Pyochelin and Its Membrane Receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **2005**, *352* (4), 893–904.
- (76) Krissinel, E. Stock-Based Detection of Protein Oligomeric States in jsPISA. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (W1), W314–W319.
- (77) Mislin, G. L. A.; Hoegy, F.; Cobessi, D.; Poole, K.; Rognan, D.; Schalk, I. J. Binding Properties of Pyochelin and Structurally Related Molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 1437–1448.
- (78) Bouyssié, D.; Hesse, A.-M.; Mouton-Barbosa, E.; Rompais, M.; Macron, C.; Carapito, C.; Gonzalez de Peredo, A.; Couté, Y.; Dupierri, V.; Burel, A.; Menetrey, J.-P.; Kalaitzakis, A.; Poisat, J.; Romdhani, A.; Buret-Schultz, O.; Cianféroni, S.; Garin, J.; Bruley, C. Proline: An Efficient and User-Friendly Software Suite for Large-Scale Proteomics. *Bioinformatics* **2020**, *36* (10), 3148–3155.
- (79) Kuhn, L.; Vincent, T.; Hammann, P.; Zuber, H. Exploring Protein Interactome Data with IPInquiry: Statistical Analysis and Data Visualization by Spectral Counts. *Methods Mol. Biol.* **2023**, *2426*, 243–265.
- (80) Gregori, J.; Sanchez, A.; Villanueva, J. *msmsTests: LC-MS/MS Differential Expression Tests*, 2019..
- (81) Vizcaíno, J. A.; Csordas, A.; del-Toro, N.; Dianes, J. A.; Griss, J.; Lavidas, I.; Mayer, G.; Perez-Riverol, Y.; Reisinger, F.; Ternent, T.; Xu, Q.-W.; Wang, R.; Hermjakob, H. 2016 Update of the PRIDE Database and Its Related Tools. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D447–D456.
- (82) Hoegy, F.; Lee, X.; Noël, S.; Mislin, G. L.; Rognan, D.; Reimann, C.; Schalk, I. J. Stereospecificity of the Siderophore Pyochelin Outer Membrane Transporters in Fluorescent Pseudomonads. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (22), 14949–14957.
- (83) Hoegy, F.; Schalk, I. J. Monitoring Iron Uptake by Siderophores. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1149*, 337–346.
- (84) Winter, G. Xia2: An Expert System for Macromolecular Crystallography Data Reduction. *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43* (1), 186–190.

(85) Winter, G.; Waterman, D. G.; Parkhurst, J. M.; Brewster, A. S.; Gildea, R. J.; Gerstel, M.; Fuentes-Montero, L.; Vollmar, M.; Michels-Clark, T.; Young, I. D.; Sauter, N. K.; Evans, G. DIALS: Implementation and Evaluation of a New Integration Package. *Acta Crystallogr., Sect. D: Struct. Biol.* **2018**, *74* (2), 85–97.

(86) Beilsten-Edmands, J.; Winter, G.; Gildea, R.; Parkhurst, J.; Waterman, D.; Evans, G. Scaling Diffraction Data in the DIALS Software Package: Algorithms and New Approaches for Multi-Crystal Scaling. *Acta Crystallogr., Sect. D: Struct. Biol.* **2020**, *76* (4), 385–399.

(87) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2004**, *60*, 2126–2132.

(88) Liebschner, D.; Afonine, P. V.; Baker, M. L.; Bunkóczy, G.; Chen, V. B.; Croll, T. I.; Hintze, B.; Hung, L.-W.; Jain, S.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R. D.; Poon, B. K.; Prisant, M. G.; Read, R. J.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C.; Sammito, M. D.; Sobolev, O. V.; Stockwell, D. H.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A. G.; Videau, L. L.; Williams, C. J.; Adams, P. D. Macromolecular Structure Determination Using X-Rays, Neutrons and Electrons: Recent Developments in Phenix. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2019**, *75* (10), 861–877.

(89) Kovalevskiy, O.; Nicholls, R. A.; Long, F.; Carlon, A.; Murshudov, G. N. Overview of Refinement Procedures within REFMAC5: Utilizing Data from Different Sources. *Acta Crystallogr., Sect. D: Struct. Biol.* **2018**, *74* (3), 215–227.

(90) Long, F.; Nicholls, R. A.; Emsley, P.; Gražulis, S.; Merkys, A.; Vaitkus, A.; Murshudov, G. N. AceDRG: A Stereochemical Description Generator for Ligands. *Acta Crystallogr., Sect. D: Struct. Biol.* **2017**, *73* (2), 112–122.



# MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

## **Structure of the Outer Membrane Transporter FemA and its Role in the Uptake of Ferric Dihydro-Aeruginic Acid and Ferric Aeruginic Acid in *Pseudomonas aeruginosa***

Virginie WILL<sup>1,2#</sup>, Lucile MOYNIÉ\*<sup>3#</sup>, Elise SI AHMED CHARRIER<sup>1,2</sup>, Audrey Le BAS<sup>3</sup>, Lauriane KUHN<sup>4</sup>,  
Florian VOLCK<sup>1,2</sup>, Johana CHICHER<sup>4</sup>, Hava AKSOY<sup>5</sup>, Morgan MADEC<sup>6</sup>, Cyril ANTHEAUME<sup>5</sup>; Gaëtan L. A.  
MISLIN<sup>1,2</sup>, Isabelle J. SCHALK\*<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> University of Strasbourg, UMR7242, ESBS, Bld Sébastien Brant, F-67412 Illkirch, Strasbourg, France

<sup>3</sup> The Rosalind Franklin Institute, Harwell Campus, Oxfordshire, UK OX11 0QS.

<sup>4</sup> Plateforme protéomique Strasbourg-Esplanade, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC),  
2 Allée Konrad Roentgen, F-67084 Strasbourg, France.

<sup>5</sup> Université de Strasbourg, Institut des Sciences et de l'Ingénierie Supramoléculaire, Plateforme  
d'analyses chimiques, 8 allée Gaspard Monge, F-67000 Strasbourg, France.

<sup>6</sup> ICube Laboratory, UMR 7357 (CNRS / University of Strasbourg), Bld Sébastien Brant, F-67412  
Illkirch, Strasbourg, France

# These authors contributed equally

## TABLE OF CONTENT

<b>CHEMISTRY</b> .....	S3
General considerations.....	S3
Protocols and analytical data .....	S4
<sup>1</sup> H-NMR spectra of compound <b>3</b> and <b>AA</b> .....	S5
<sup>13</sup> C-NMR spectra of compound <b>3</b> and <b>AA</b> .....	S7
LC-HRMS spectra of compound <b>3</b> and <b>AA</b> .....	S9
<b>MASS SPECTROMETRY</b> .....	S11
Mass spectra profiling.....	S11
<b>MICROBIOLOGY</b> .....	S21
Additional figures.....	S21
Strains and plasmids.....	S29
Primers used for the construction of the mutants.....	S30
Primers used for RT-qPCR experiments.....	S31
<b>STRUCTURAL BIOLOGY</b> .....	S32
Additional figures.....	S32
Crystallographic data and refinement statistics.....	S38
<b>BIBLIOGRAPHY</b> .....	S39

## CHEMISTRY

### General considerations

**Chemicals.** DHA was prepared according to previously described protocols.<sup>1,2</sup> Compounds **3** and **AA** were prepared according to procedures described in page S4 of the present ESI file. PCH and neoPCH were synthesized according to a protocol developed by our team. PCH is a siderophore with 3 asymmetric centers (C4', C2'' and C4''). Depending if D-cystein or L-cystein is used as starting material, the protocols developed by our team lead respectively to PCH or to neoPCH. The reaction conditions result in the partial epimerization of the C4' chiral center. The C2'' of the thiazolidine ring in PCH exists as a thioaminal and is therefore inherently racemized<sup>3</sup>. Finally, the configuration of the C4'' chiral center, remains unaffected during synthesis. Consequently, PCH was synthesized from D-cystein as a mixture of four stereoisomers, with 75 % of PCH and 25 % of neoPCH. Starting the synthesis with L-cystein, neoPCH is obtained as a mixture of four stereoisomers, with 75 % of neoPCH and 25 % of PCH. It was shown that metal ion has a template effect on both PCH and neoPCH leading to a fixed *R* configuration of C2'' in the respective complexes<sup>4-6</sup>. All reactions were carried out under argon (technical quality, Air products). Solvents used were of analytical grade purity (>99.9%). When necessary, solvents and bases were purchased extra-dry. All other chemicals were obtained from commercial suppliers and were used as received, unless otherwise stated.

**Chromatographic analysis and purifications.** All reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using Merck precoated silica gel 60F<sup>254</sup> (0.25 mm). TLC are visualized using UV (254 nm/365 nm, VL-4LC Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany) and/or using classical revelation mixtures (sulfuric vaniline, potassium permanganate, ninhydrin reagent). Compounds were also detected on TLC using a 2% hydromethanolic solution of FeCl<sub>3</sub>. Before chromatographic purification reaction mixtures were adsorbed on silica gel (60-200 μm, VWR Chemicals). Chromatographic purifications were performed on a Selekt (Biotage, Uppsala, Sweden) purification device using PuriFlash® pre-packed silica gel columns (Interchim, Montluçon, France).

**Spectrometric and spectroscopic analysis.** NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz) or Avance 500 (<sup>1</sup>H: 500 MHz, <sup>13</sup>C: 125 MHz), using the residual non-deuterated solvent as reference. The chemical shifts ( $\delta$ ) and coupling constants (*J*) are expressed in ppm and hertz respectively. Multiplicity is indicated as follow: s for singlet, d for doublet, t for triplet, q for quadruplet, quint for quintuplet and m for a multiplet. The letter "b" before the multiplicity indicates a broaden signal. Mass spectra were recorded in the Service Commun d'Analyses (SCA) de la Faculté de Pharmacie

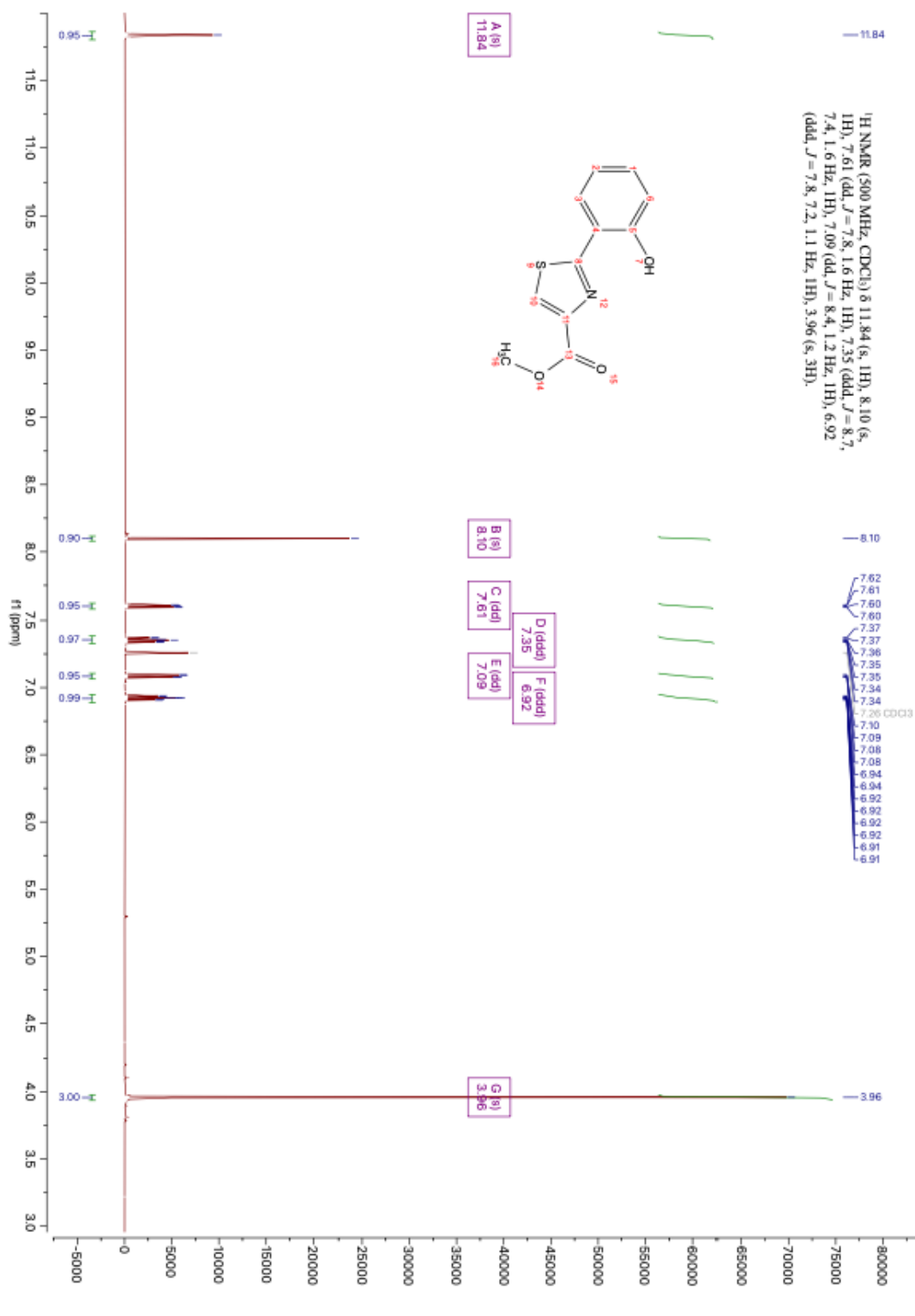
de l'Université de Strasbourg LC/HRMS conditions : Analytical RP-HPLC-MS was performed using a LC 1200 Agilent with quadrupole-time-of-flight (QTOF) (Agilent Accurate Mass QToF 6520) with a Zorbax Agilent C18-column (C18, 50 mm x 2.1 mm; 1.8  $\mu$ m) using the following parameters: The solvent system: A (acetonitrile + 0.05% formic acid) and B (H<sub>2</sub>O + 0.05% formic acid); Gradient (Tmin,(%B)): T0 (98%), T4(0%), T8(0%), T8.1(98%). Flow rate of 0.5 mL/min; Column temperature: 40°C; DAD scan from 190 nm to 700 nm. Ionization mode: ESI<sup>+</sup>. For HRMS, the calculated and the found mass correspond to M. Original ions repartition could be found in ions table and simulation given in section D of the present ESI.

#### Protocols and analytical data

Methyl 2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-4-carboxylate 3: A solution of DHA (199 mg, 0.89 mmol) in SOCl<sub>2</sub> (2 mL, 27.57 mmol) was stirred 10 mn at 80°C. When gas emission stopped, the resulting solution was cooled down to room temperature before being concentrated under reduced pressure. The resulting brownish oily residue was cooled in an ice bath and carefully resuspended with 10mL of a MeOH:NEt<sub>3</sub>; 9:1 mixture and then stirred at 20°C for 20h. The reaction mixture was diluted with DCM (100 mL) before being washed with an 10% aqueous solution of citric and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The desiccant was filtered off and the organic phase was adsorbed on silica gel under reduced pressure. A purification by chromatography on a silica gel column (gradient: cyclohexane:Et<sub>2</sub>O; 100:0 to cyclohexane:Et<sub>2</sub>O; 50:50) led to the expected compound **3** isolated as a white solid (90 mg, 0.38 mmol, yield : 43% over two combined steps). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  11.84 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.61 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.35 (ddd, *J* = 8.7, 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.92 (ddd, *J* = 7.8, 7.2, 1.1 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  161.1, 157.2, 145.8, 132.7, 127.5, 125.3, 119.7, 118.3, 116.4, 52.6. HRMS: calculated for C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S: 235.0303; found: 235.0308.

2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-4-carboxylic acid (AA): To a solution of methyl 2-(2-hydroxyphenyl)-1,3-thiazole-4-carboxylate **3** (52 mg, 0.22 mmol in MeOH (8 mL), an aqueous solution of NaOH 5M (0.7 mL, 87.37 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 65 °C for 3h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and the oily residue was dissolved in water (20 mL). A 10% aqueous solution of citric acid was added to reach pH 2.0-3.0. The resulting precipitate was filtered-off, washed with water and dried under reduced pressure. The resulting product **AA** was obtained as a white solid (35 mg, 0.16 mmol, yield: 73%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  13.03 (s, 1H), 11.29 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.13 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.51 – 7.22 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  163.62, 162.20, 155.18, 145.98, 131.52, 128.44, 127.60, 119.60, 118.70, 116.55. HRMS: calculated for C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S: 221.0147; found: 221.0144

**<sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 3 and AA**



**Figure S1.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 3 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

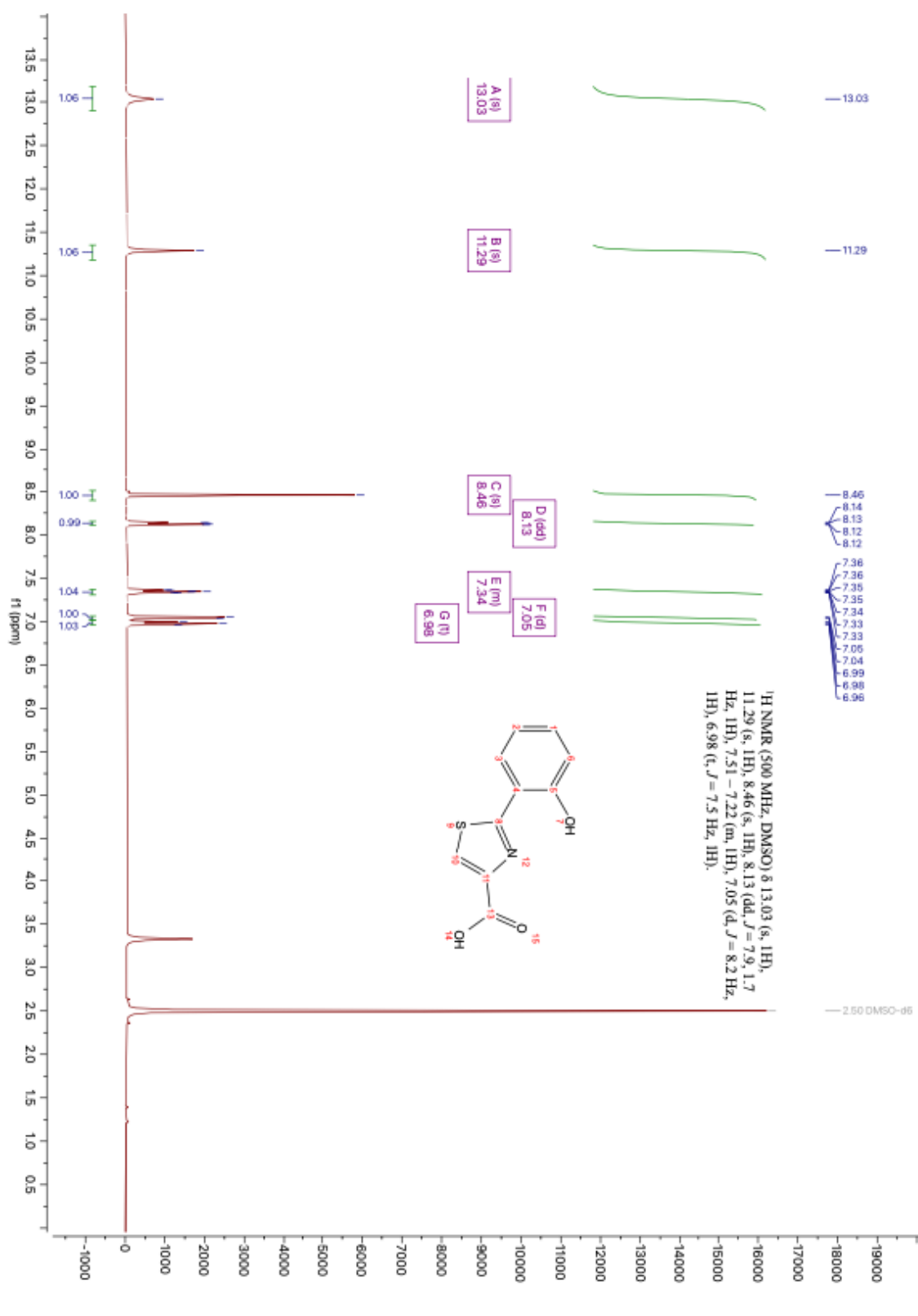
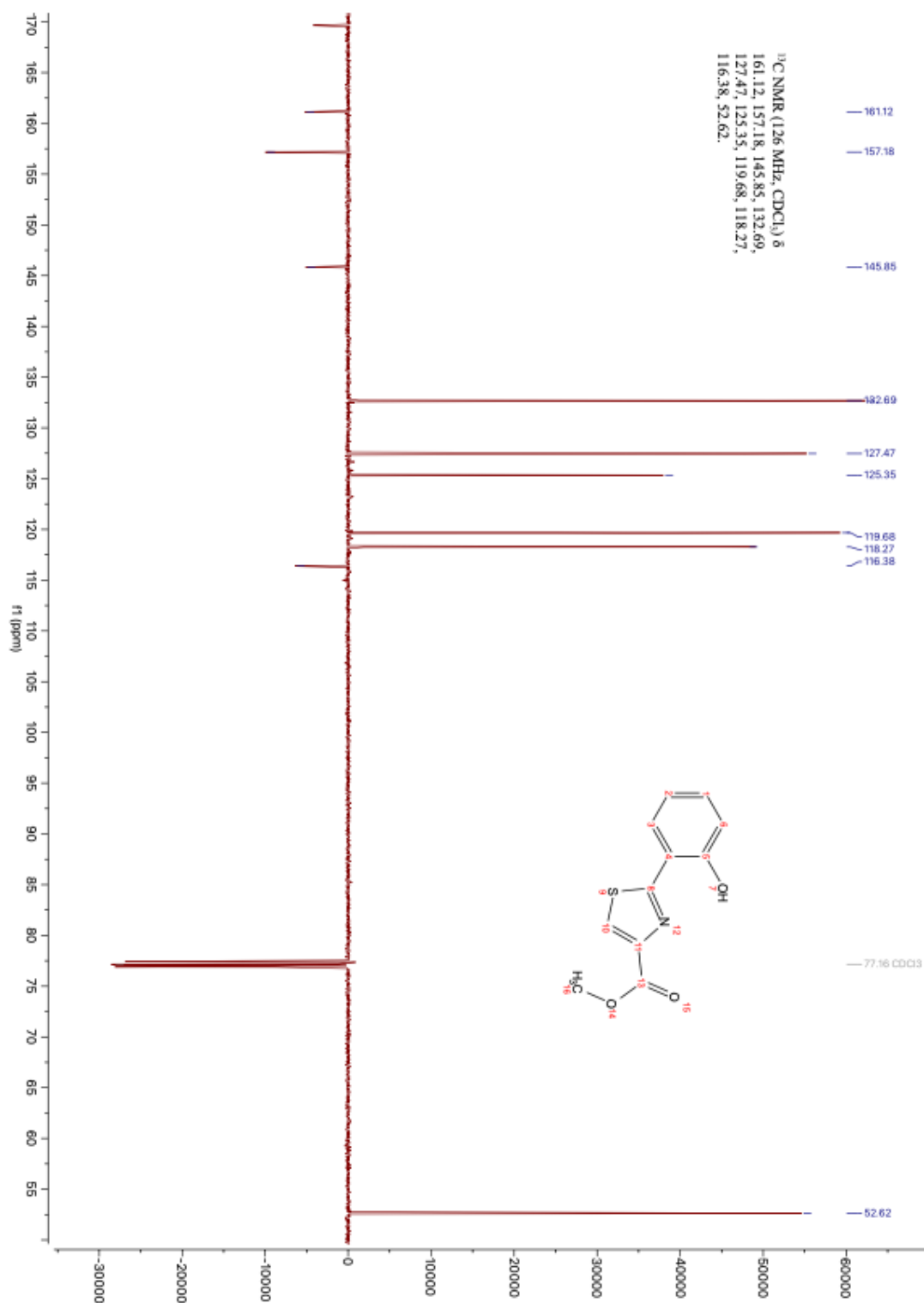


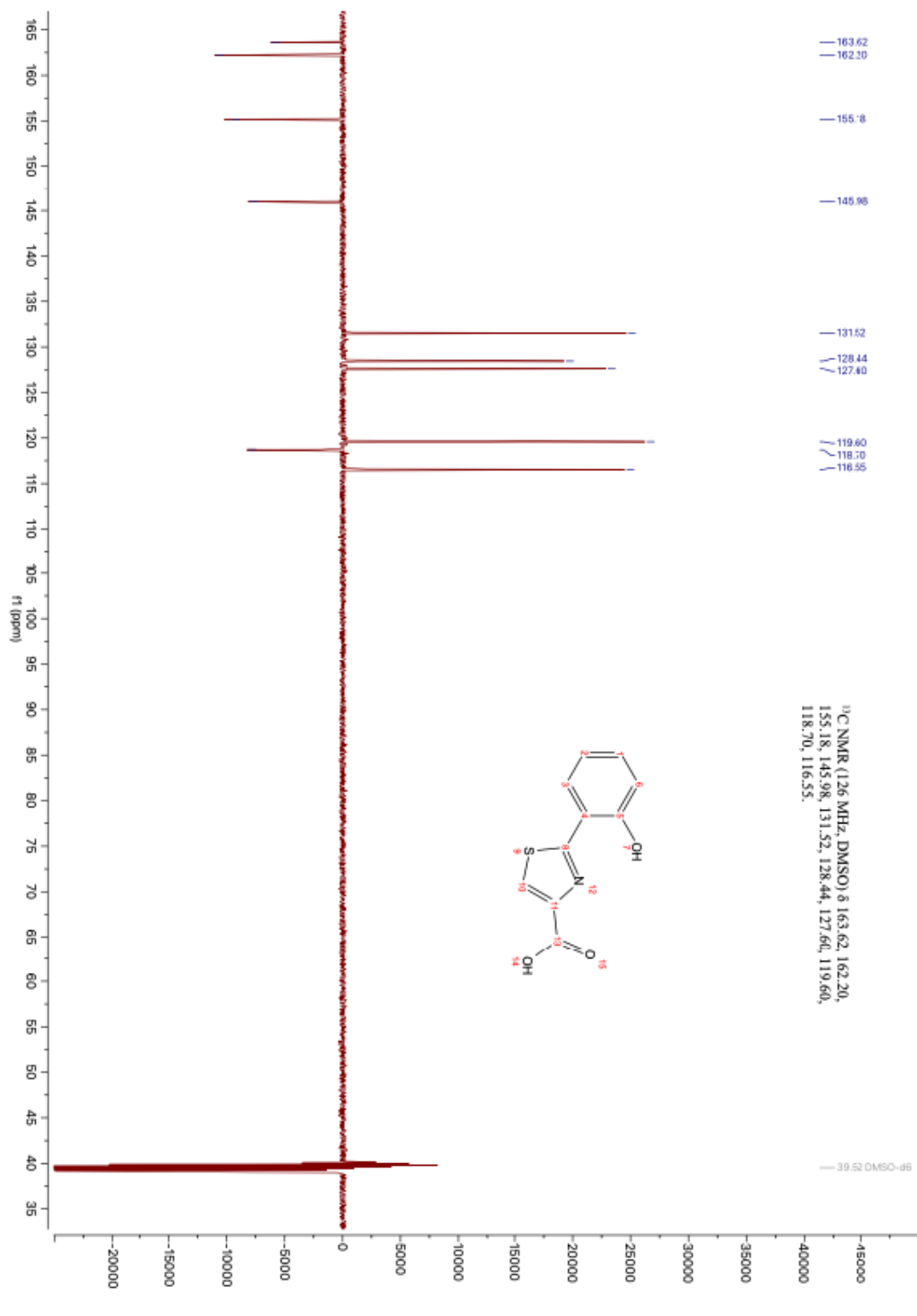
Figure S2. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of AA (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

**<sup>13</sup>C-NMR spectra of compound 3 and AA**



**Figure S3.** <sup>13</sup>C-NMR (DeptQ) spectrum of compound 3 (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz).

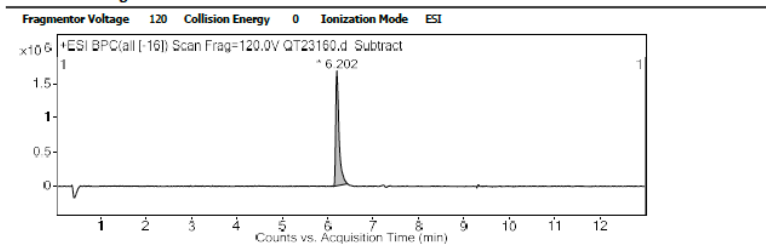




**Figure S4.** <sup>13</sup>C-NMR (DeptQ) spectrum of **AA** (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz).

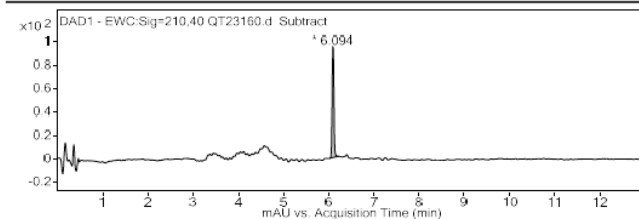
## HRMS spectra of compound 3 and AA

### User Chromatograms



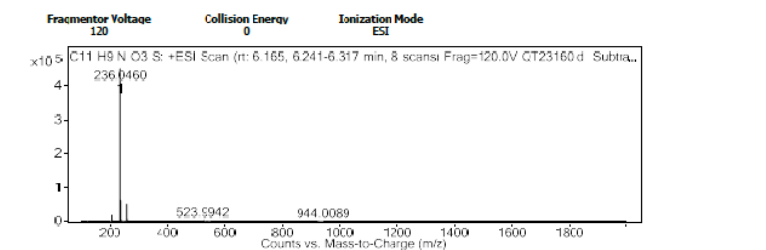
### Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	6.137	6.202	6.435	1679846.66	8352817.88	100	100



### Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	6.034	6.094	6.214	94.74	262.6	100	100



### Peak List

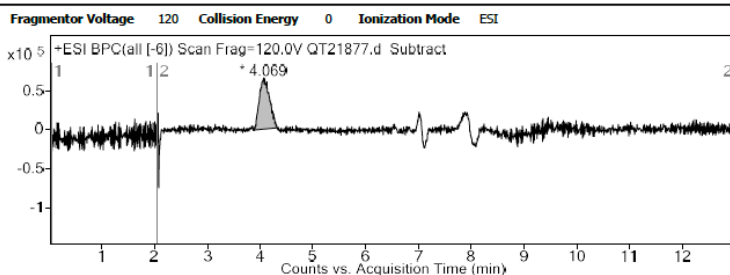
m/z	z	Abund	Formula	Ion
204.0179	1	19225.05		
236.046	1	449593.73	C8 H11 N3 O2 S	(M+Na)+
236.1779	1	33732.42		
237.0486	1	61479.89	C8 H11 N3 O2 S	(M+Na)+
238.045	1	27259.16	C8 H11 N3 O2 S	(M+Na)+
239.0471	1	3542.06	C8 H12 N2 O3 S	(M+Na)+
258.0279	1	50126.28		
259.0308	1	6496.77		
260.0263	1	2823.84		
523.9942	1	2599.09		

### Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
C11 H9 N O3 S	VKAL	235.0308	235.0303	-2.2	235.0303	C11 H9 N O3 S	46.47
C11 H8 N O3 S	VRAI	234.023	234.0225	-2.21	235.0303	C11 H9 N O3 S	46.47
C8 H11 N3 O2 S		213.0569	213.0572	1.39	236.046	C8 H11 N3 Na O2 S	96.32
C8 H12 N2 O3 S		216.0574	216.0569	-2.3	239.0471	C8 H12 N2 Na O3 S	63.25

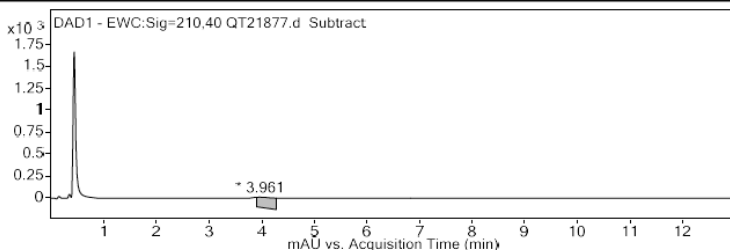
Figure S5. LC-HRMS of compound 3 (ESI)

User Chromatograms



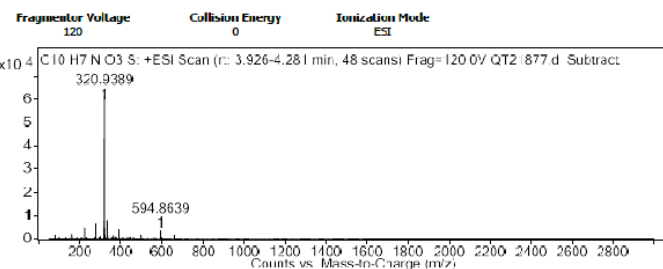
Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	3.865	4.069	4.348	66026.32	879579.81	100	100



Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	3.901	3.961	4.274	116.28	2730.48	100	100



Peak List

m/z	z	Abund	Formula	Ion
222.0217	1	4894.38	C10 H7 N O3 S	(M+H)+
274.9332	1	6654.98		
315.9597	1	43931.6		
316.9623	1	7633.66		
318.945	1	4095.09		
320.9389	1	62388.42		
321.9413	1	9934.6		
322.9373	1	4285.38		
333.97	1	7798.79		
388.9262	1	4037.67		

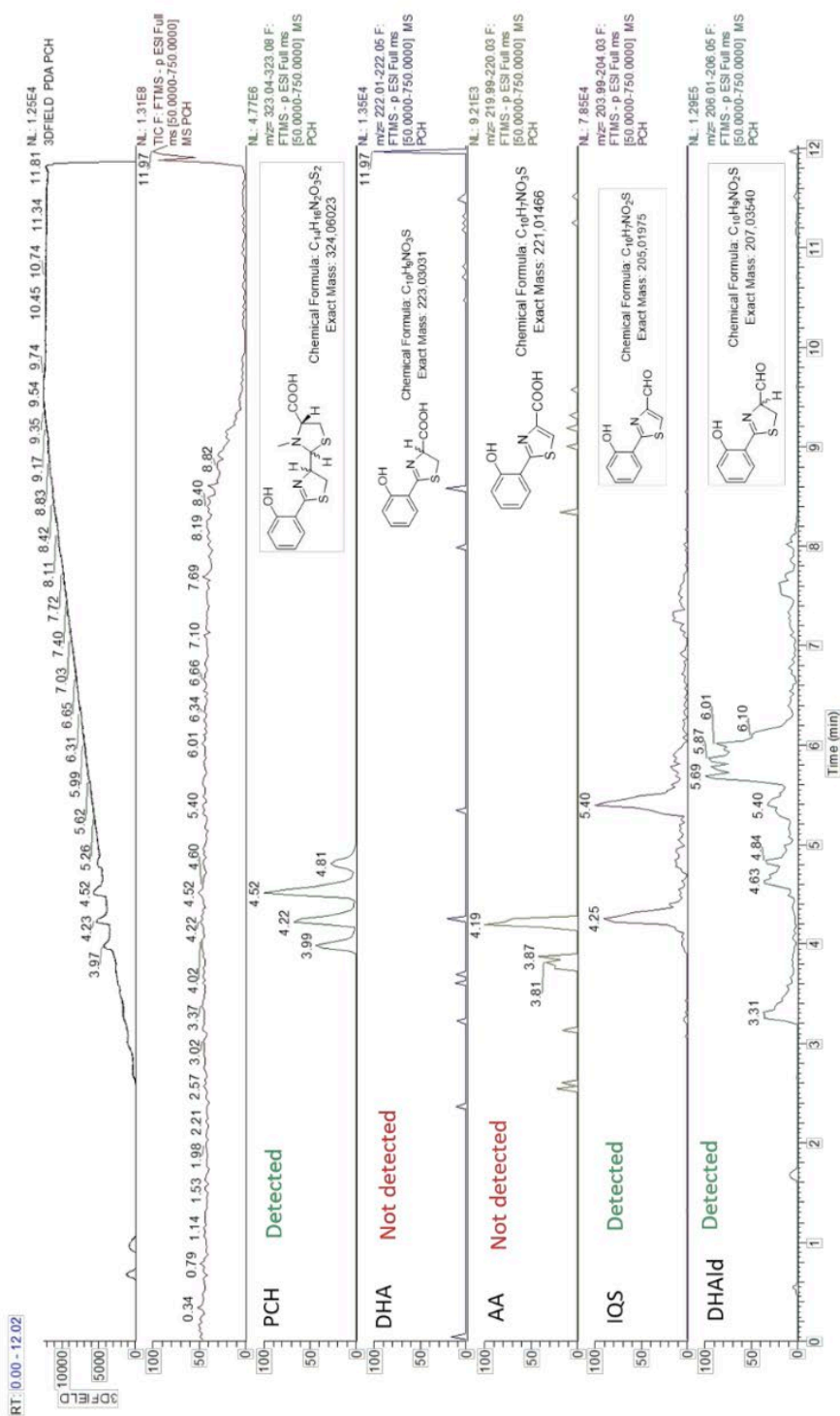
Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
C10 H8 N O3 S		222.0223	222.0225	1.04	222.0217	C10 H8 N O3 S	97.3
C10 H7 N O3 S	VRA:	221.0144	221.0147	1.05	222.0217	C10 H8 N O3 S	97.3
C11 H7 N2 S		199.0325	199.033	2.33	222.0217	C11 H7 N2 Na S	95.81
C8 H11 N2 O S		183.0586	183.0592	3.37	222.0217	C8 H11 K N2 O S	84.27
C10 H4 O3 S		203.9879	203.9881	1.13	222.0217	C10 H8 N O3 S	97.3
C3 H4 N5 O S2		203.9882	203.9888	2.78	222.0217	C3 H8 N / O S2	80.48

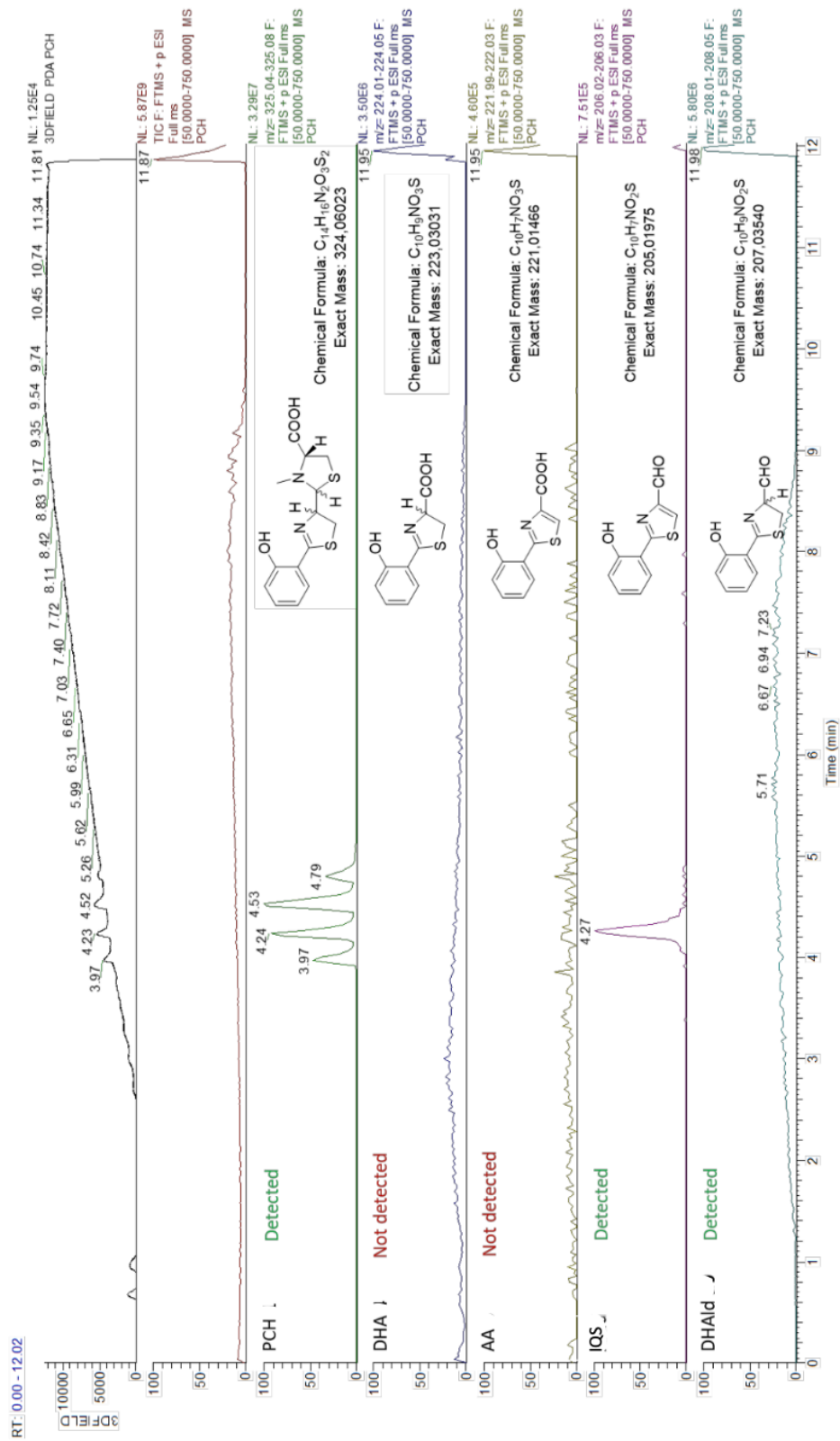
Figure S6. LC-HRMS of AA (ESI).

# MASS SPECTROMETRY

## Mass spectra profiling

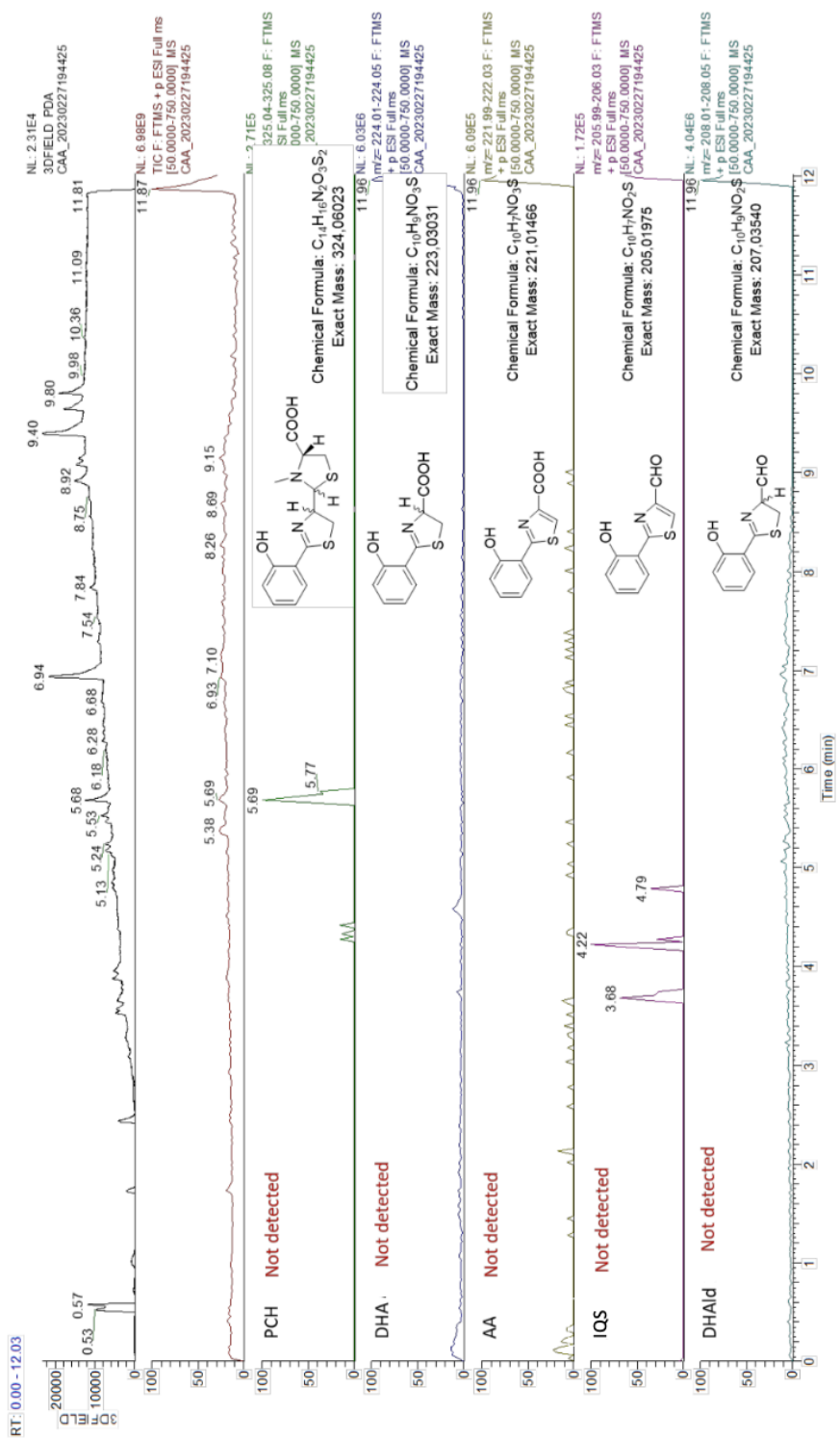


**Figure S7.** UV total scan, total and extracted-ion chromatogram (ESI) from UPLC-DAD-HRMS of synthetic PCH batch.

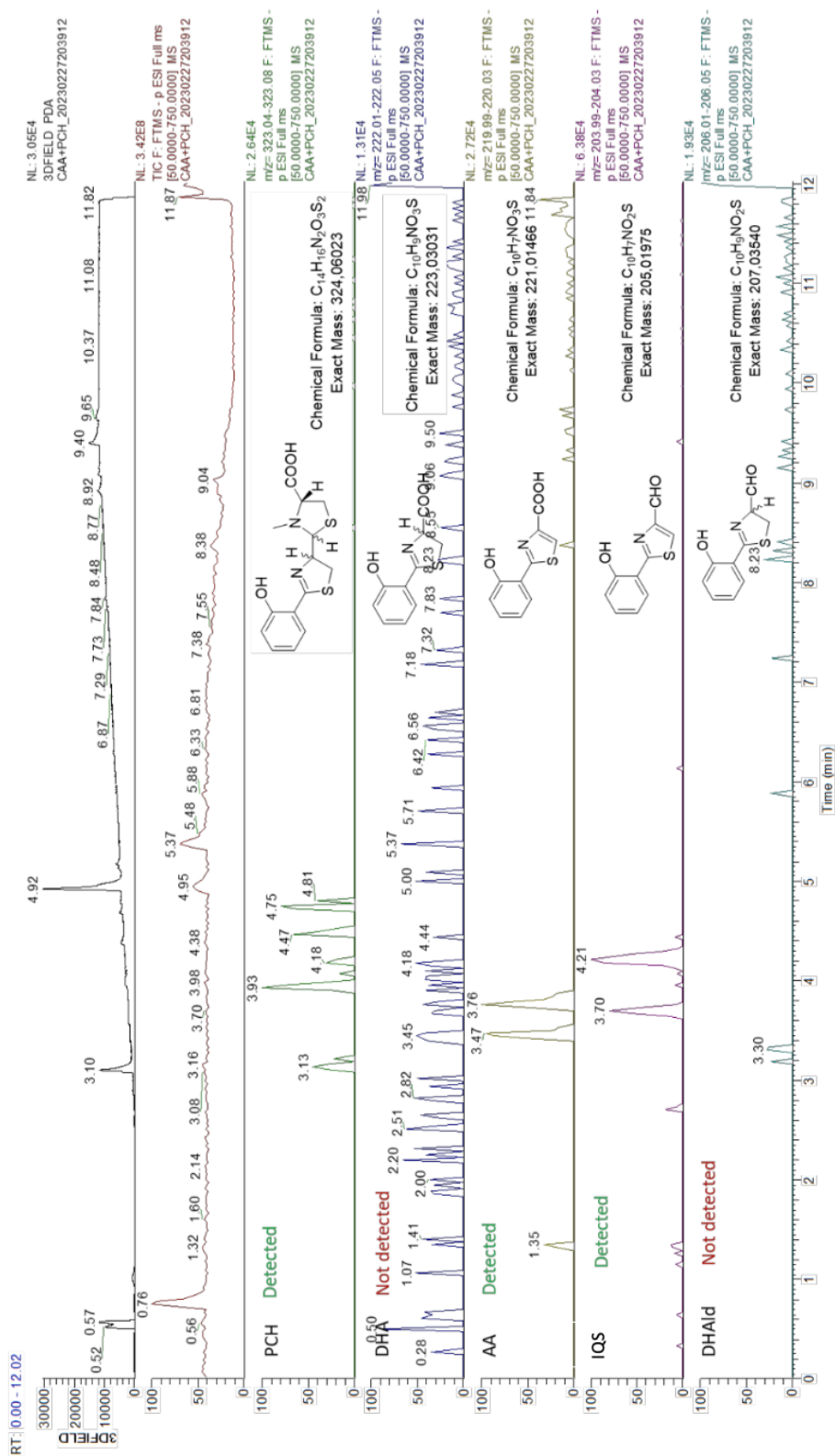


**Figure S8.** UV total scan, total and extracted-ion chromatogram (ESI+) from UPLC-DAD-HRMS of synthetic pyochelin batch.



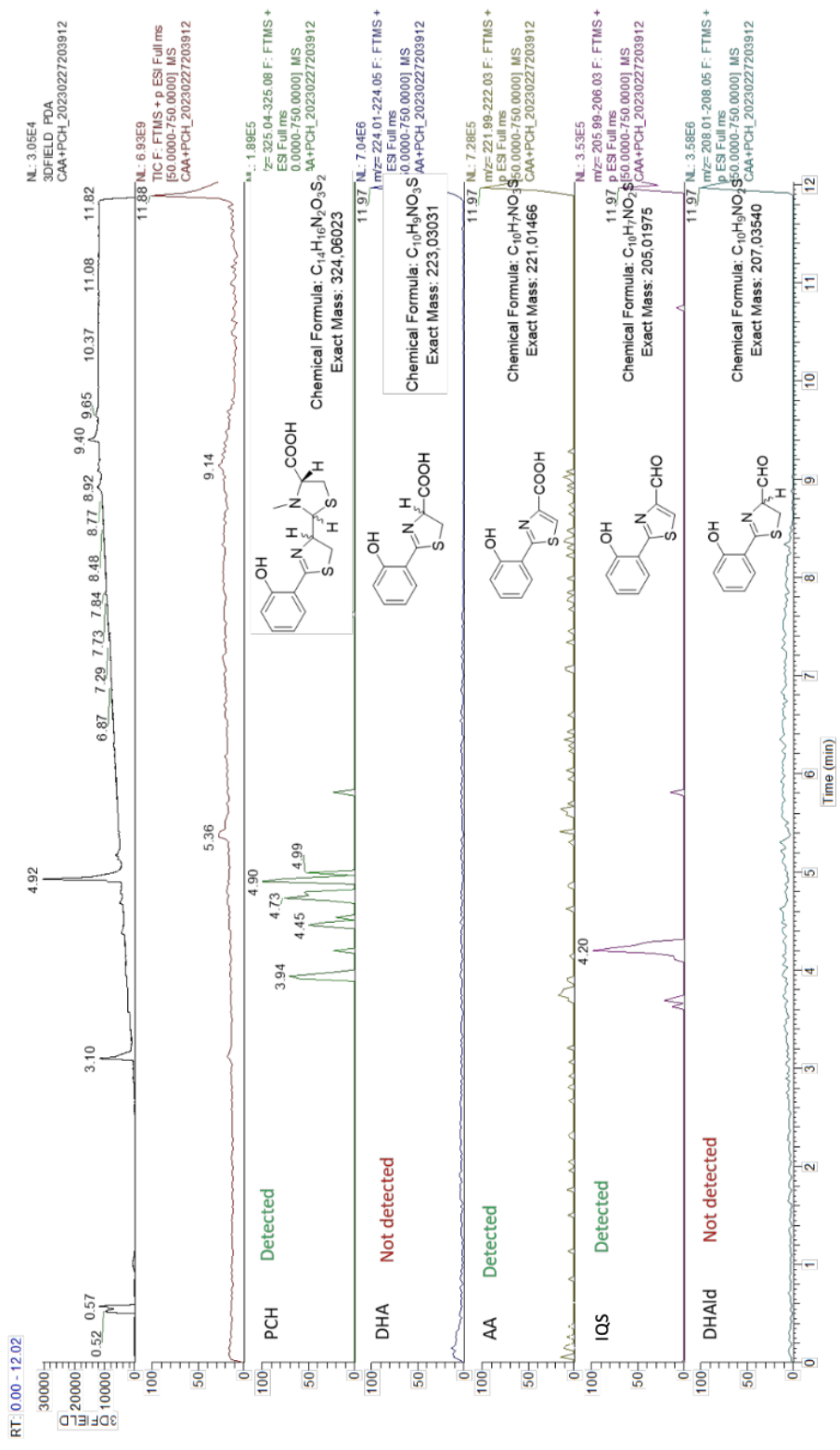


**Figure S10.** UV total scan, total and extracted-ion chromatogram (ESI+) from UPLC-DAD-HRMS of an extraction of pure CAA medium.

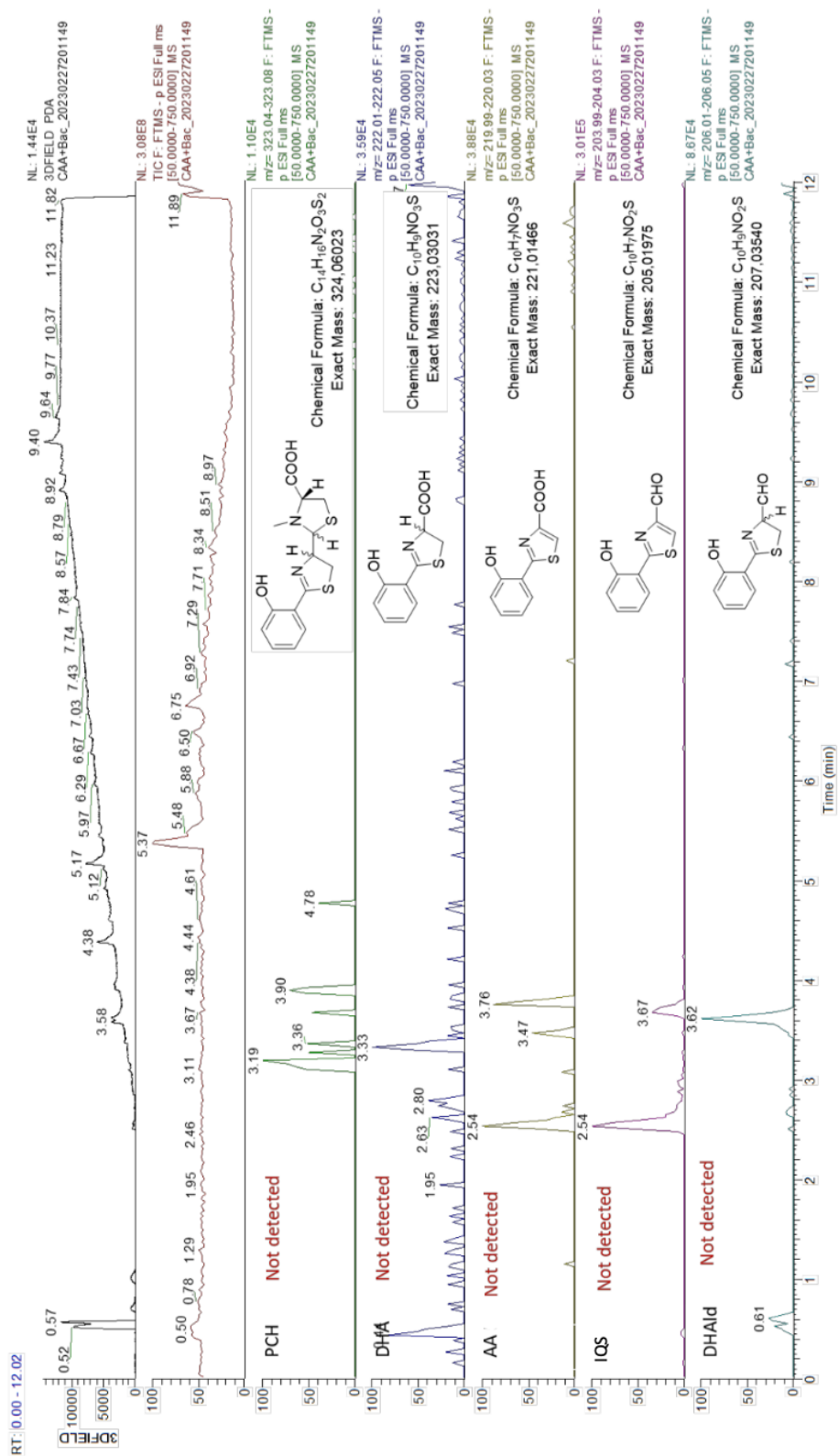


**Figure S11.** UV total scan, total and extracted-ion chromatogram (ESI-) from UPLC-DAD-HRMS of extracted CAA (15 h incubation at 30°C after adding 10 μM of PCH).

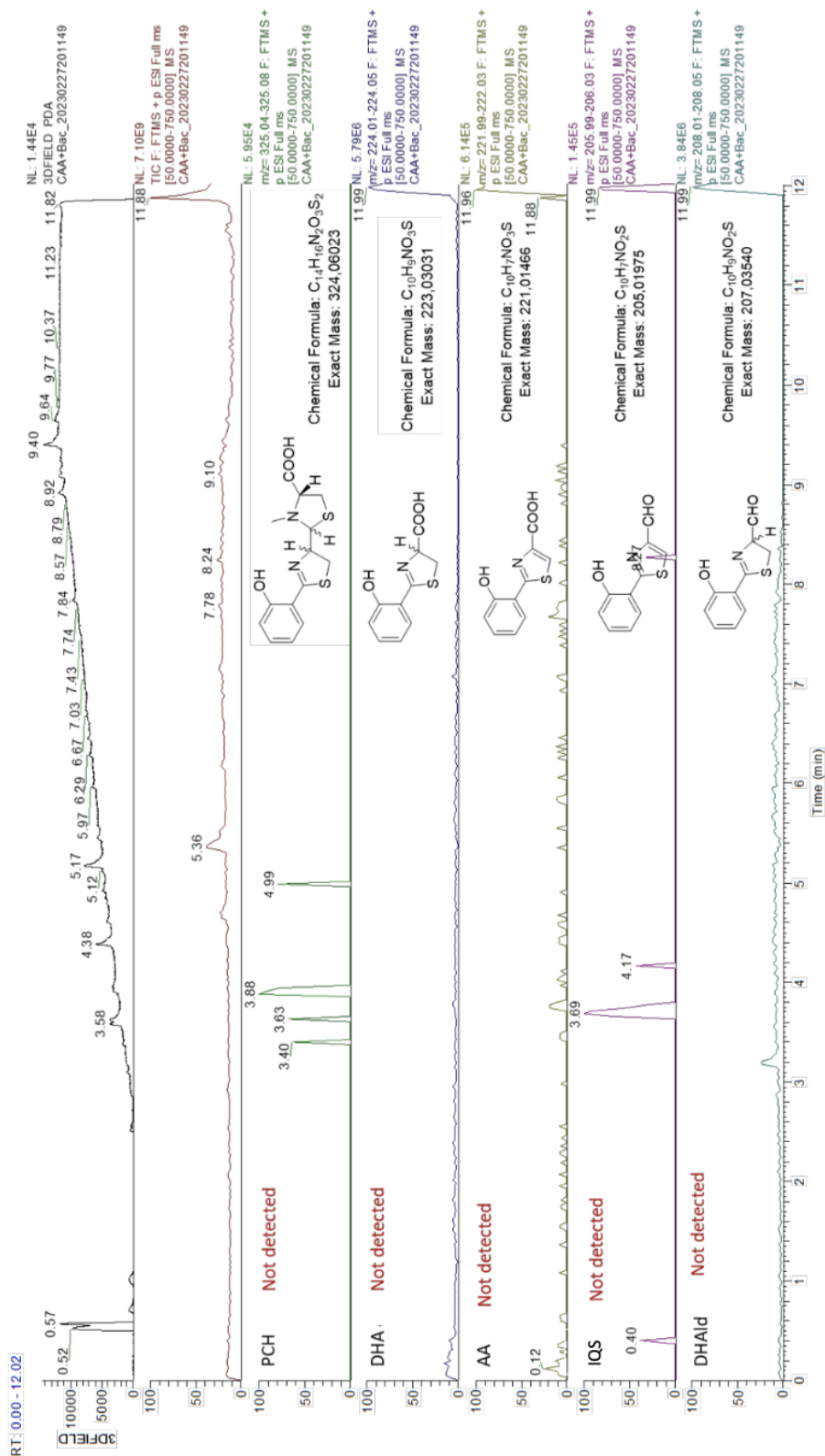




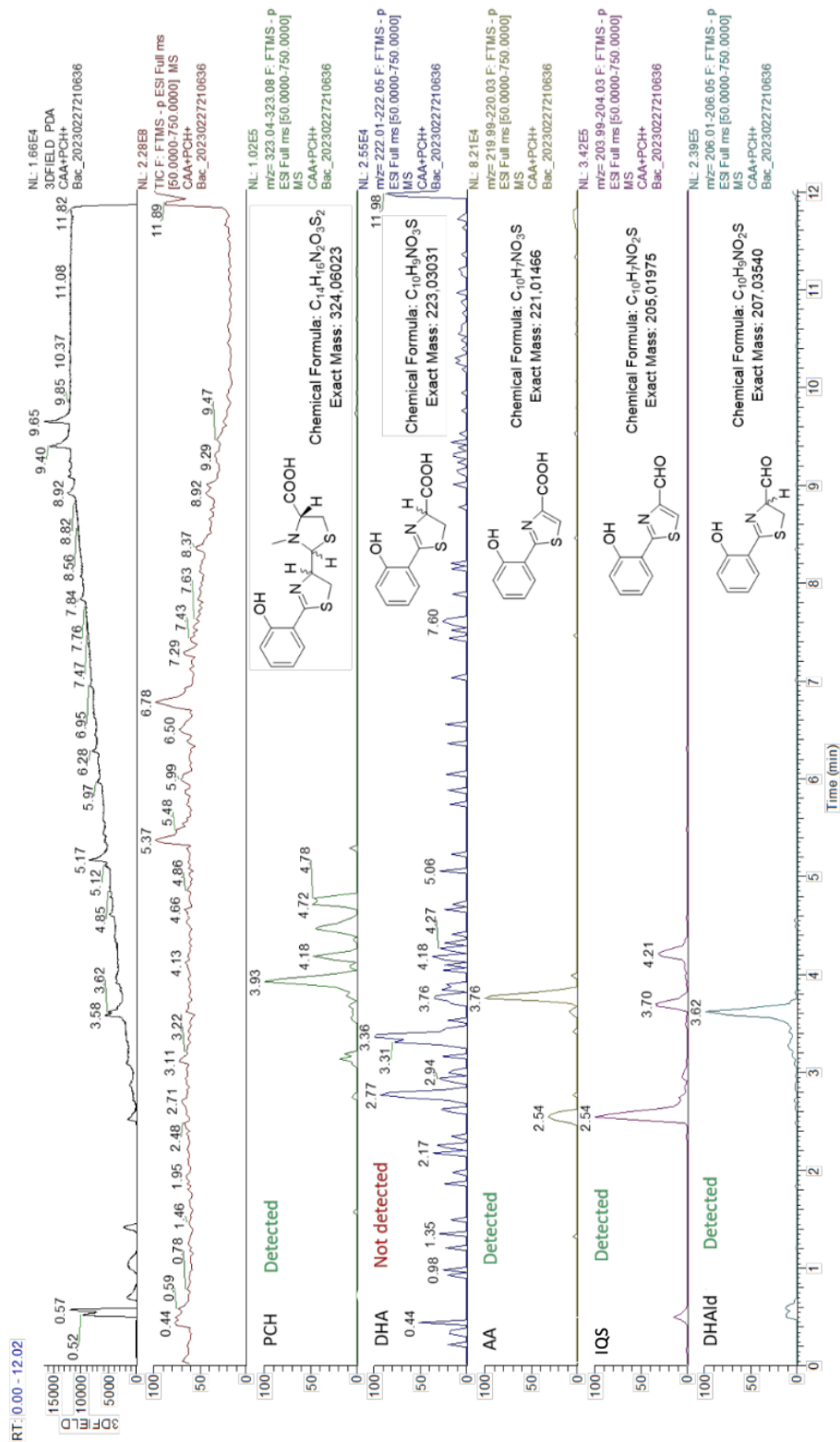
**Figure S12.** UV total scan, total and extracted-ion chromatogram (ESI+) from UPLC-DAD-HRMS of extracted CAA (15 h incubation at 30°C after adding 10 μM of PCH).



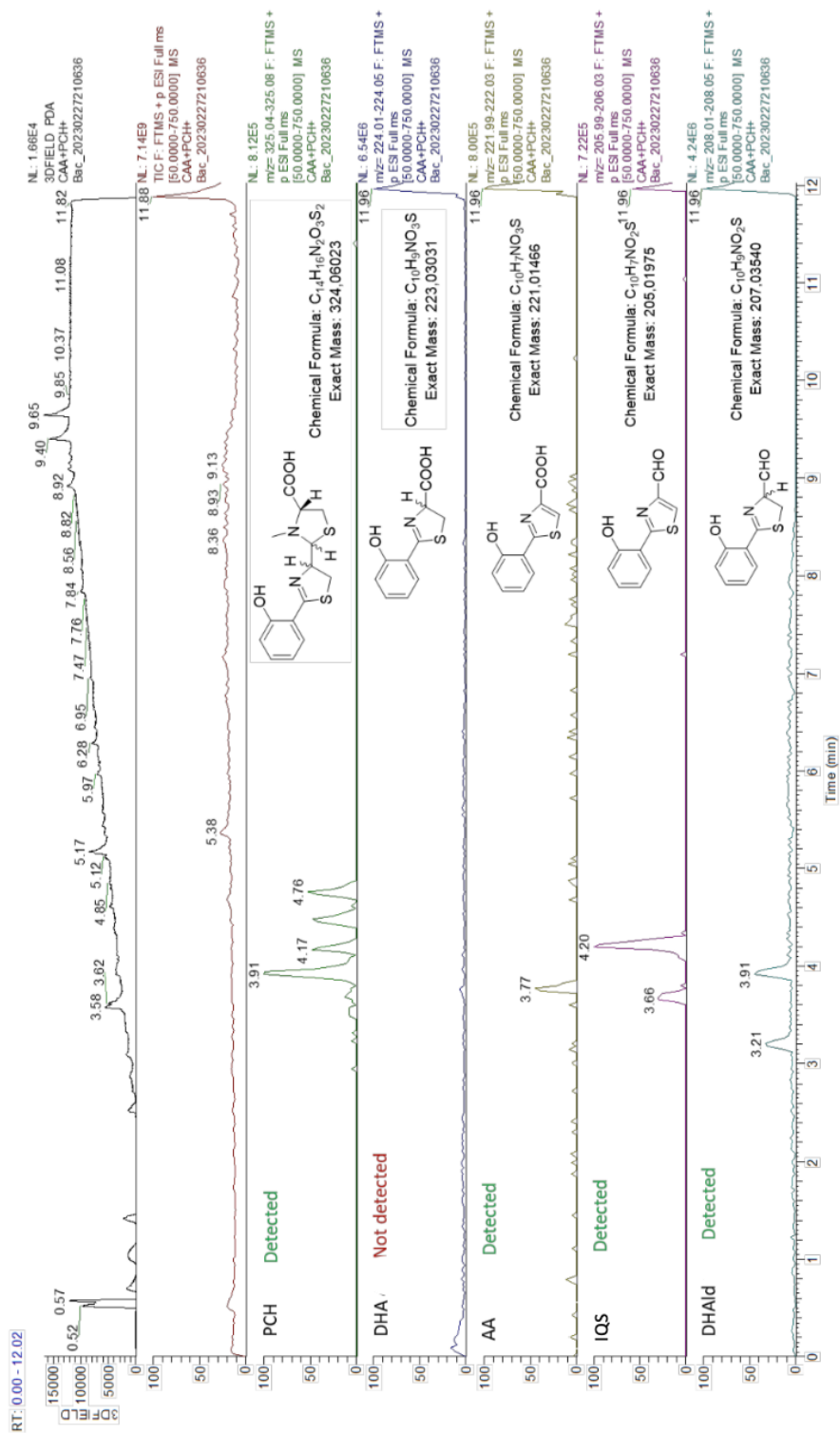
**Figure S13.** UV total scan, total and extracted-ion chromatogram (ESI-) from UPLC-DAD-HRMS of extracted CAA culture broth after 15h incubation at 30°C with PAO1  $\Delta$ *pvdF* $\Delta$ *pchA*.



**Figure S14.** UV total scan, total and extracted-ion chromatogram (ESI+) from UPLC-DAD-HRMS of extracted CAA culture broth after 15h incubation at 30°C with PAO1  $\Delta pvd\Delta pchA$ .



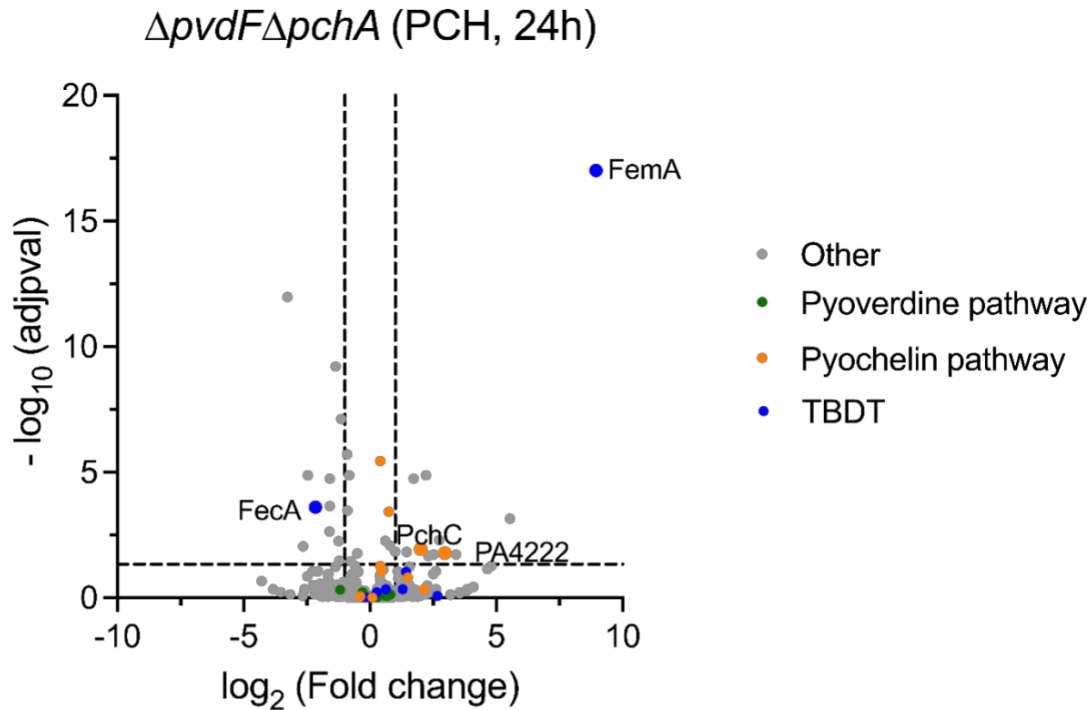
**Figure S15.** UV total scan, total and extracted-ion chromatogram (ESI-) from UPLC-DAD-HRMS of extracted CAA culture broth of PAO1  $\Delta pvd\Delta pchA$  after 15 h incubation at 30°C in the presence of 10  $\mu$ M of PCH.



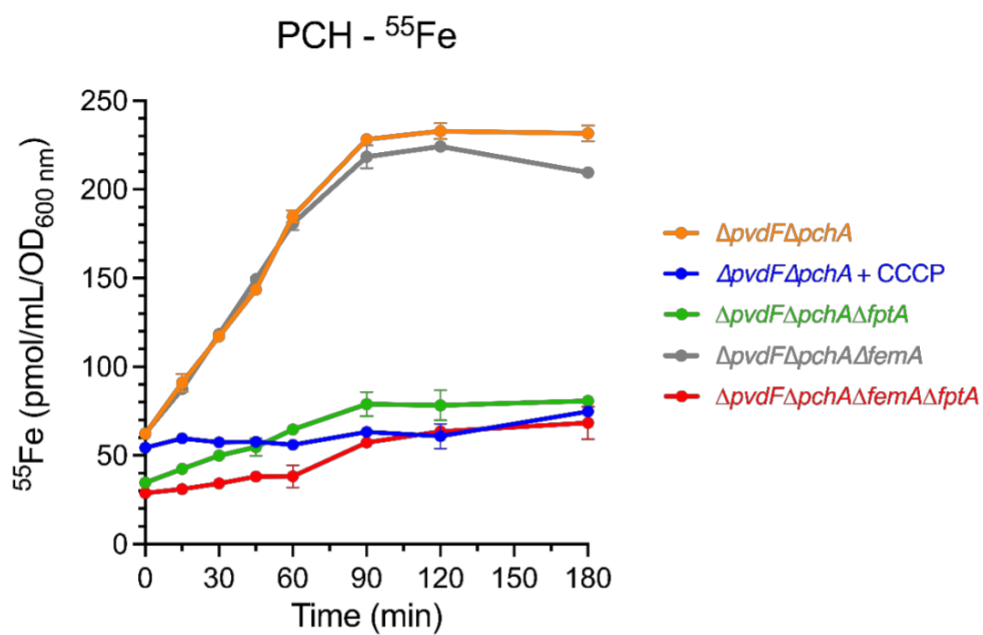
**Figure S16.** UV total scan, total and extracted-ion chromatogram (ESI+) from UPLC-DAD-HRMS of extracted CAA culture broth of PAO1  $\Delta pvd\Delta pchA$  after 15 h incubation at 30°C in the presence of 10  $\mu$ M of PCH.

## MICROBIOLOGY

Additional figures

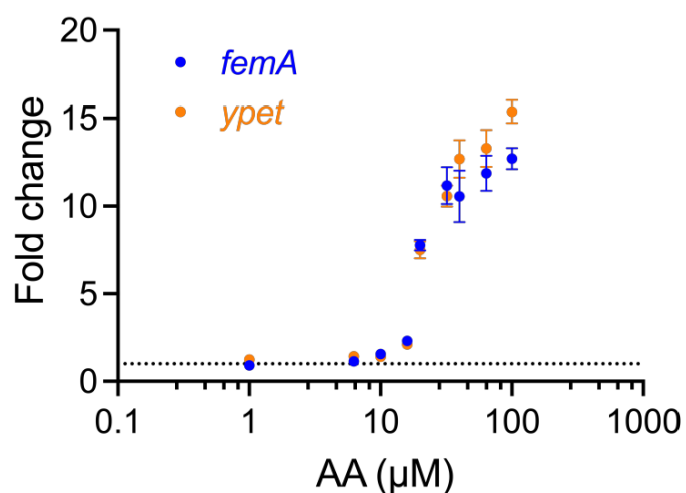


**Figure S17. Modulation of protein expression in *P. aeruginosa* strain unable to produce pyoverdine and PCH in the presence of PCH.** Proteomic analyses were conducted on the  $\Delta pvdF\Delta pchA$  strain grown for 24 hours in CAA medium supplemented with 10  $\mu\text{M}$  of PCH. Median values measured for the cultures supplemented with 10  $\mu\text{M}$  PCH were plotted against those measured without the supplementation of PCH. The volcano plot displays  $\log_2$ -fold changes in protein abundances and corresponding  $-\log_{10}$ -transformed p-values relative to untreated control samples. Proteins associated with the PCH pathway are denoted by orange dots, those linked to the pyoverdine pathway by green dots, and the TBBDs by blue dots.



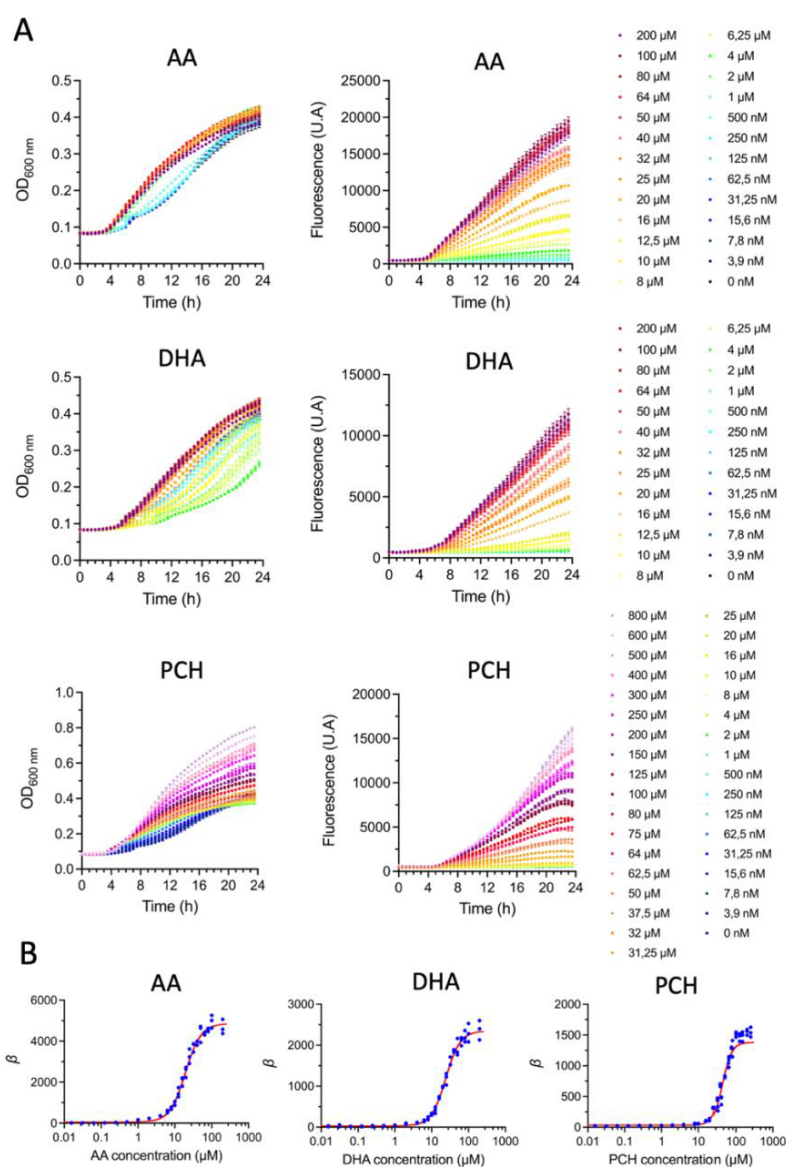
**Figure S18.**  $^{55}\text{Fe}$  uptake via PCH in *P. aeruginosa* strains grown with 100  $\mu\text{M}$  PCH. The assay was conducted exactly as described in Figure 6, except that the bacteria were grown in the presence of 100  $\mu\text{M}$  PCH.

$\Delta pvdF\Delta pchA P_{femA}\text{-ypet}$

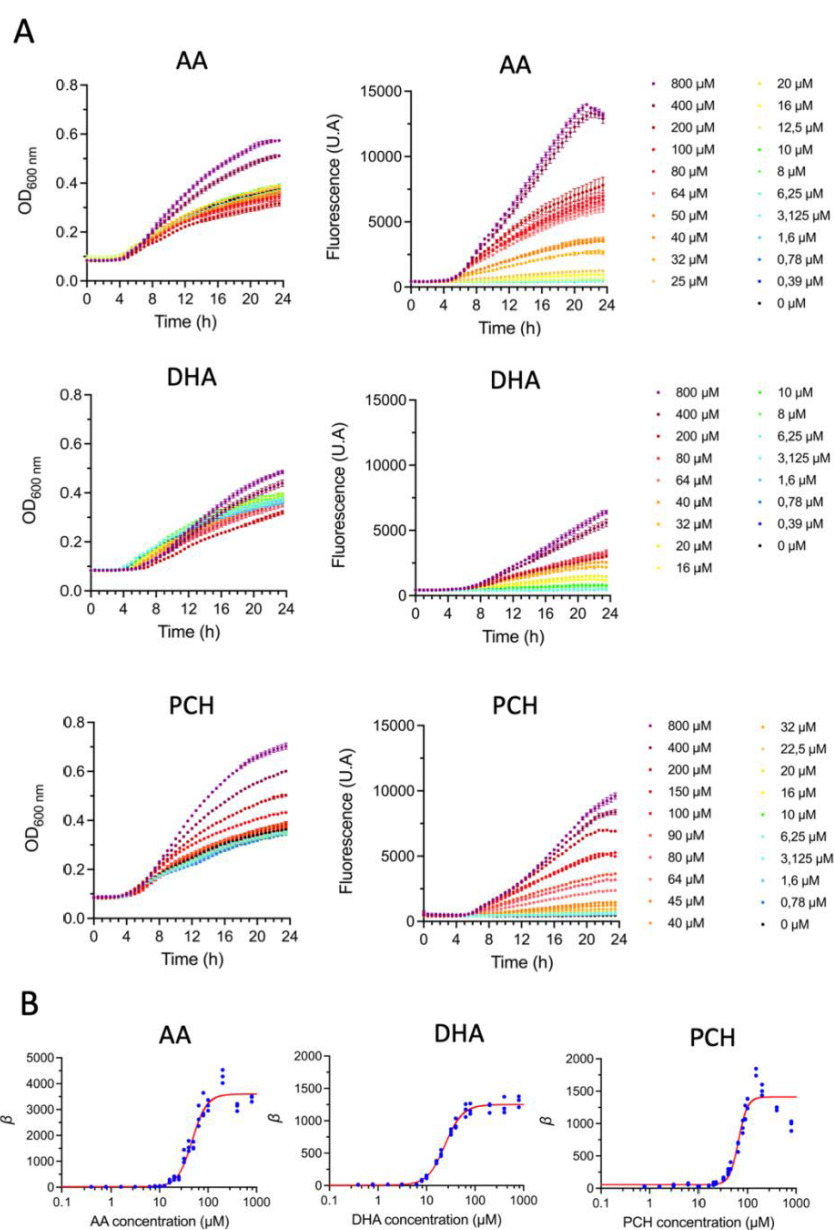


**Figure S19. Correlation between *ypet* and *femA* transcription in  $\Delta pvdF\Delta pchA\text{-}P_{femA}\text{-ypet}$  cells in the presence of increasing concentrations of AA.** The *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA\text{-}P_{femA}\text{-ypet}$  strain was grown for 8 h in CAA medium in the absence or presence of increasing concentrations of AA (1  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 32  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 64  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  of AA). The transcription of *femA* (blue) and *ypet* (orange) was followed by RT-qPCR in  $\Delta pvdF\Delta pchA\text{-}P_{femA}\text{-ypet}$  strain. 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 AA was tested using biological triplicates. The error bars represent the standard errors calculated by CFX Maestro™ Software (Bio-Rad). The reference genes used were *rpsL* and *clpX*.

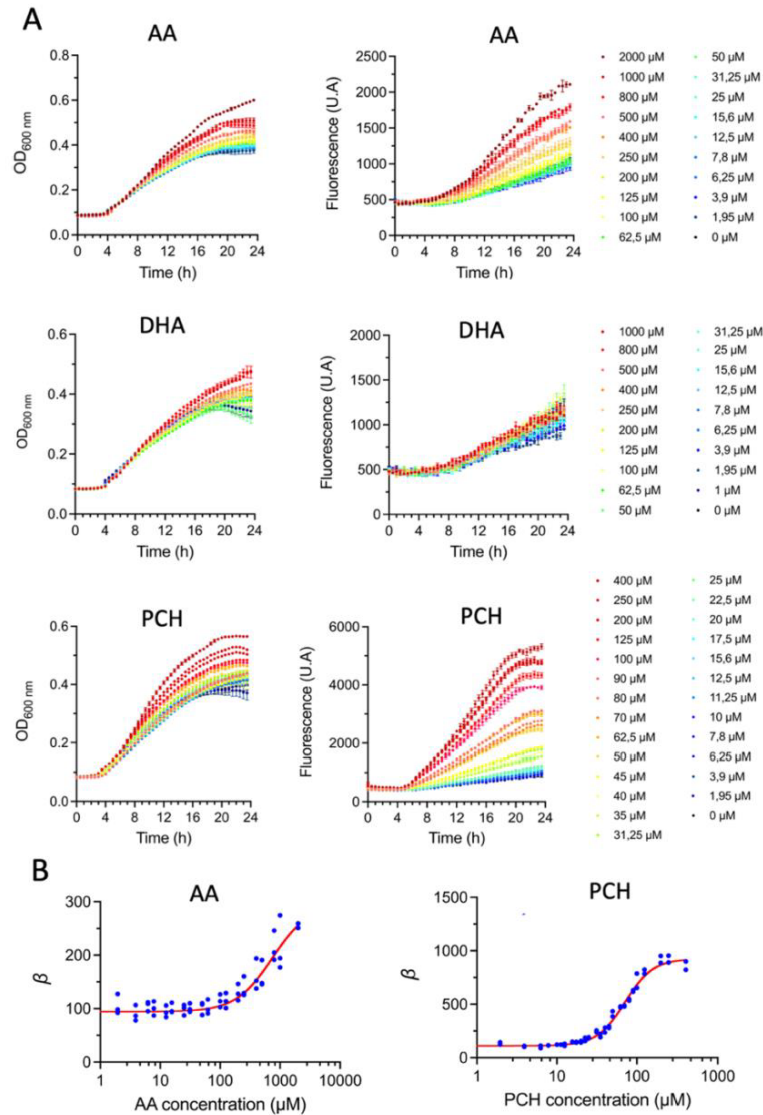




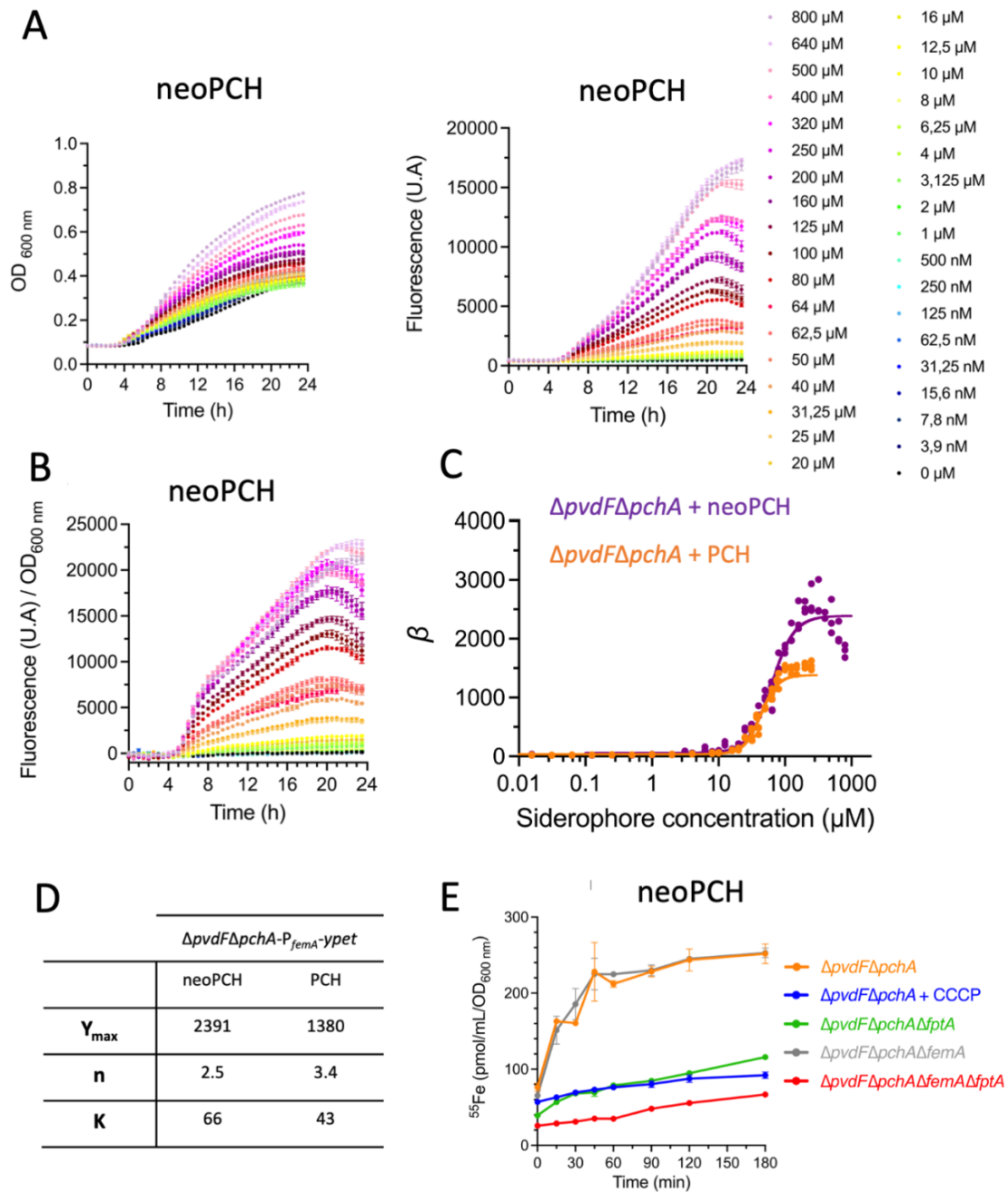
**Figure S20. OD<sub>600 nm</sub> and YPet fluorescence monitored in  $\Delta pvdF\Delta pchA-P_{femA}-ypet$  in the presence of AA, DHA or PCH. A.**  $\Delta pvdF\Delta pchA-P_{femA}-ypet$  strain was grown in CAA medium in the absence or presence of increasing concentrations of AA, DHA or PCH, and the OD<sub>600 nm</sub> and fluorescence of YPet (excitation at 500 nm and emission at 540 nm) monitored. Three independent experiments, each with three technical replicates, were performed for each concentration of AA, DHA and PCH tested ( $n = 3$ ). The mean and the standard deviation of the three biological replicates are shown. **B.** The  $\beta$  values of the  $\Delta pvdF\Delta pchA-P_{femA}-ypet$  strain for the three data points are plotted against the concentrations of AA, DHA, and PCH, respectively. The sigmoid curves (in red) were fitted using the Hill equation (2).



**Figure S21. OD<sub>600 nm</sub> and YPet fluorescence monitored in  $\Delta pvdF$ -P<sub>femA</sub>-ypet in the presence of AA, DHA or PCH.** **A.**  $\Delta pvdF$ -P<sub>femA</sub>-ypet strain was grown in CAA medium in the absence or presence of increasing concentrations of AA, DHA or PCH, and the OD<sub>600 nm</sub> and fluorescence of YPet (excitation at 500 nm and emission at 540 nm) monitored. Three independent experiments, each with three technical replicates, were performed for each concentration of AA, DHA and PCH tested (n = 3). The mean and the standard deviation of the three biological replicates are shown. **B.** The  $\beta$  values of the  $\Delta pvdF$ -P<sub>femA</sub>-ypet strain for the three data points are plotted against the concentrations of AA, DHA, and PCH, respectively. The sigmoid curves (in red) were fitted using the Hill equation (2).



**Figure S22. OD<sub>600 nm</sub> and YPet fluorescence monitored in PAO1-*P<sub>femA</sub>-ypet* in the presence of AA, DHA or PCH. A.** PAO1-*P<sub>femA</sub>-ypet* strain was grown in CAA medium in the absence or presence of increasing concentrations of AA, DHA or PCH, and the OD<sub>600 nm</sub> and fluorescence of YPet (excitation at 500 nm and emission at 540 nm) monitored. Three independent experiments, each with three technical replicates, were performed for each concentration of AA, DHA and PCH tested ( $n = 3$ ). The mean and the standard deviation of the three biological replicates are shown. **B.** The  $\beta$  values of the PAO1-*P<sub>femA</sub>-ypet* strain for the three data points are plotted against the concentrations of AA and PCH, respectively. The sigmoid curves (in red) were fitted using the Hill equation (2). The  $\beta$  values could not be determined for DHA.



**Figure S23. A-D. *femA* expression in function of neoPCH concentrations in *ΔpvdFΔpchA-P<sub>femA</sub>-ypet* strain. A.** *ΔpvdFΔpchA-P<sub>femA</sub>-ypet* strain was grown in CAA medium in the absence or presence of increasing concentrations of neoPCH and the OD<sub>600 nm</sub> and fluorescence of YPet (excitation at 500 nm and emission at 540 nm) monitored. Three independent experiments, each with three technical replicates, were performed for each concentration of neoPCH tested (n = 3). The mean and the standard deviation of the three biological replicates are shown. **B.** The data obtained are treated as described in **Figure 7**. **C.** The β values of the *ΔpvdFΔpchA-P<sub>femA</sub>-ypet* strain for each biological replicate are plotted against the concentrations of neoPCH and compared to those obtained for PCH (**Figure 7**).

The sigmoid curves were fitted using the Hill equation (2), and the obtained parameters are summarized in the Table (D).  $y_0$ , minimum of expression;  $y_{max}$ , maximum of expression;  $n$ , the Hill coefficient, which describes the cooperativity in the studied biological system;  $K$ , the concentration of ligand ( $\mu\text{M}$ ) at which half of the maximum expression is observed. **E.  $^{55}\text{Fe}$  uptake by *P. aeruginosa* strains mediated by neoPCH.** *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  cells were grown in iron-restricted CAA medium in the presence of 100  $\mu\text{M}$  neoPCH, to induce expression of *fptA* and *femA*. Afterwards, bacteria were incubated with 500 nM neoPCH- $^{55}\text{Fe}$ . The amount of  $^{55}\text{Fe}$  taken up by the bacteria was measured as a function of time. As a control, the experiment was repeated in the presence of the protonophore CCCP (200  $\mu\text{M}$ ). As in **Figure 6**, the experiment was also repeated with the corresponding  $\Delta fptA$  and  $\Delta femA$  deletion mutants of  $\Delta pvdF\Delta pchA$  ( $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA$  and  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA\Delta fptA$ ). Error bars were calculated from three independent biological replicates.

## Strains and plasmids

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

Strains and plasmids	Collection ID	Relevant characteristics	Reference
<b><i>P. aeruginosa</i></b>			
$\Delta pvdF\Delta pchA$	PAS283	PAO1; <i>pvdF</i> and <i>pchA</i> chromosomally deleted	<sup>7</sup>
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA$	PAS598	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> and <i>femA</i> chromosomally deleted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$	PAS638	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> and <i>fptA</i> chromosomally deleted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA\Delta fptA$	PAS669	PAO1; <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , <i>femA</i> and <i>fptA</i> chromosomally deleted	This study
PAO1- $P_{femA}$ - <i>ypet</i>	PAS816	PAO1; <i>femA</i> promoter and <i>ypet</i> chromosomally inserted	This study
$\Delta pvdF$ - $P_{femA}$ - <i>ypet</i>	PAS872	PAO1; <i>pvdF</i> chromosomally deleted; <i>femA</i> promoter and <i>ypet</i> chromosomally inserted	This study
$\Delta pvdF\Delta pchA$ - $P_{femA}$ - <i>ypet</i>	PAS862	PAO1; <i>pvdF</i> and <i>pchA</i> chromosomally deleted; <i>femA</i> promoter and <i>ypet</i> chromosomally inserted	This study
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
TOP10		F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> $\lambda$ -	Invitrogen
NEB® 5-alpha Competent		<i>huA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> )U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	New England Biolabs
C43 (DE3)		F – <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> ( <i>rB</i> - <i>mB</i> -) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	Invitrogen
<b>Plasmids</b>			
pEXG2	pEXG2	allelic exchange vector with pBR origin, gentamicin resistance, <i>sacB</i>	<sup>8</sup>
pEXG2 $\Delta femA$	pSF02	pEXG2 carrying the sequence to delete <i>femA</i>	This study
pEXG2 $\Delta fptA$	pBR48	pEXG2 carrying the sequence to delete <i>fptA</i>	This study
pEXG2 $P_{femA}$ - <i>ypet</i>	pps1	pEXG2 carrying the sequence to insert <i>femA</i> promoter and <i>ypet</i>	This study
pTAMAHISTEV		Expression vector with a N-terminal TAMA signal peptide followed by an tobacco etch virus protease cleavable His7-tag	<sup>9</sup>
pTAMAHISTEV_ <i>femA</i>		pTAMAHISTEV carrying the sequence of <i>femA</i> for overexpression in <i>E. coli</i>	This study

**Primers used for the construction of the mutants**

**Table S2. Primers used for the construction of the  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fptA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta femA\Delta fptA$ , PAO1- $P_{femA}$ -*ypet*,  $\Delta pvdF$ - $P_{femA}$ -*ypet*,  $\Delta pvdF\Delta pchA$ - $P_{femA}$ -*ypet* and the strains for *femA* expression and purification.**

Oligonucleotides	Gene	Sequence
FemAStart-789 HindIII R	<i>femA</i>	ATATATAAGCTTTGACCCTGCCCGACGGCA
FemAStartAmontFoverlap	<i>femA</i>	GACGCGGTTCCAGTGCGGGAGGGCGAGGGTCATGGC
FemAStopAvalR	<i>femA</i>	CCGCACTGGAACCGCGTC
FemAStop + 745 SacIF	<i>femA</i>	ATATATGAGCTCGGCGCGGTCAATTCGCC
Del FptA-500UPHindIII	<i>fptA</i>	CCGGAAGCTTGGCGTGGATATCCGCCGTTGAGC
Del FptA-500DOEcoRI	<i>fptA</i>	CCGGGAATTCGCCCGAACAGGCTGACCAGCACCC
Del ATG- <i>fptA</i> rev	<i>fptA</i>	CTCCGTTTTTCATCGTTCGAACAGC
Del STOP- <i>fptA</i> for	<i>fptA</i>	GCTGTTCGAACGATGAAAACGGAGTGCCGCGCCAGTCGG GCTTCGGCTGG
pEXG2 <i>femA</i> for	<i>PfemA</i>	GACCACGAGGAACCCTGTACATGAGCAAAGGCGAAGAAC T
pEXG2 <i>femA</i> rev	<i>PfemA</i>	CAGTAGTCGGTCACCCCGGACTAGTTACGTGGCCTGTGA CG
<i>femA</i> for	<i>PfemA</i>	CTACAGGCCACGTAAGTACGCGGGGTGACCGAC
<i>femA</i> rev	<i>PfemA</i>	AGTTCTTCGCCTTTGCTCATGTACAGGGTTCCTCGTGGTCT
femA_Fwd_BspHI	<i>femA</i>	5'- GTCATGACCCCCGCCCTGCTTGCC
femA_Rv_BamH	<i>femA</i>	5'- GGATCCTCAGAAGTCCGCCGTGAGGGAAA

### Primers used for RT-qPCR experiments

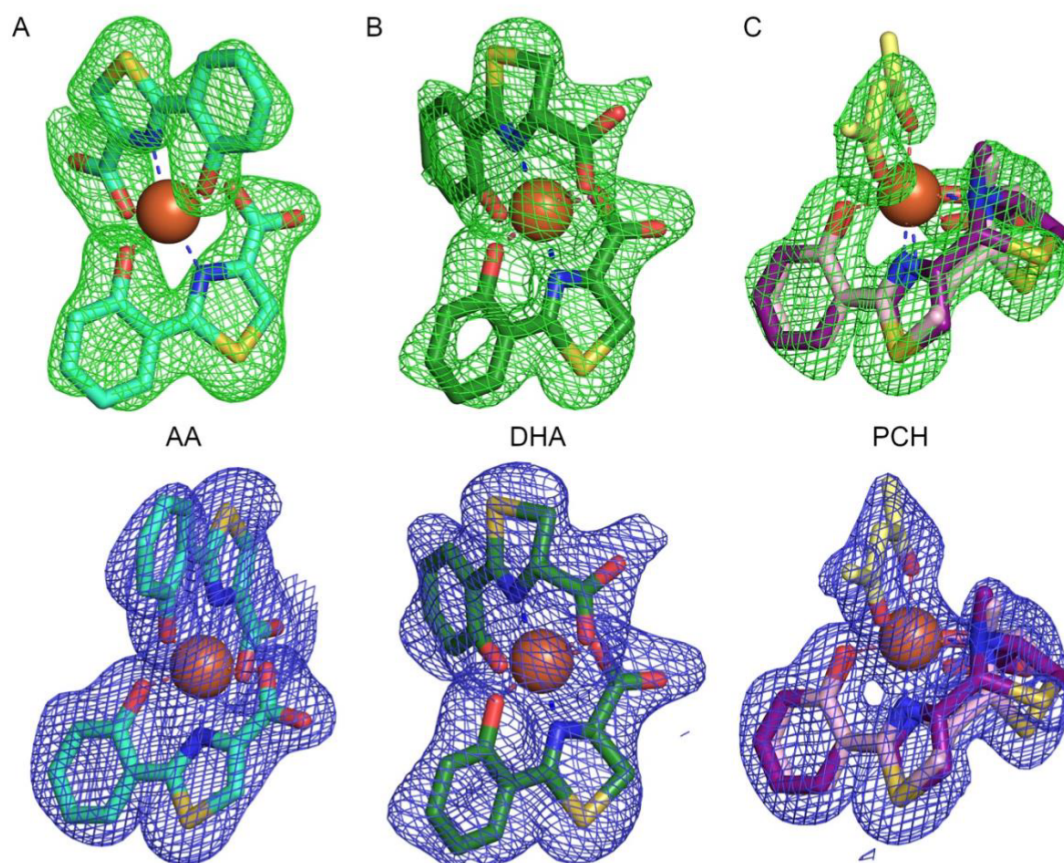
Table S3. Primers used for RT-qPCR experiments.

Oligonucleotides	Sequence (5' to 3')
<i>uvrD</i> F	CTACGGTAGCGAGACCTACAACAA
<i>uvrD</i> R	GCGGCTGACGGTATTGGA
<i>clpX</i> F	CTGCGCTCATGCAGATCCT
<i>clpX</i> R	TCGAACAGCTTGGCGTACTG
<i>rpsL</i> F	TACACCACCACGCCGAAAA
<i>rpsL</i> R	CACCACCGATGTACGAGGAA
<i>fpvA</i> F	AGCCGCCTACCAGGATAAGC
<i>fpvA</i> R	TGCCGTAATAGACGCTGGTTT
<i>fptA</i> F	GCGCCTGGGCTACAAGATC
<i>fptA</i> R	CCGTAGCGTTGTTCCAGTT
<i>femA</i> F	CATTCCGAAGACCAATGAAACC
<i>femA</i> R	TGACCTGCACGCGATCCT
<i>ypet</i> F	ATATCCTGGGCCACAACTG
<i>ypet</i> R	CATCACCAATCGGGGTATTC

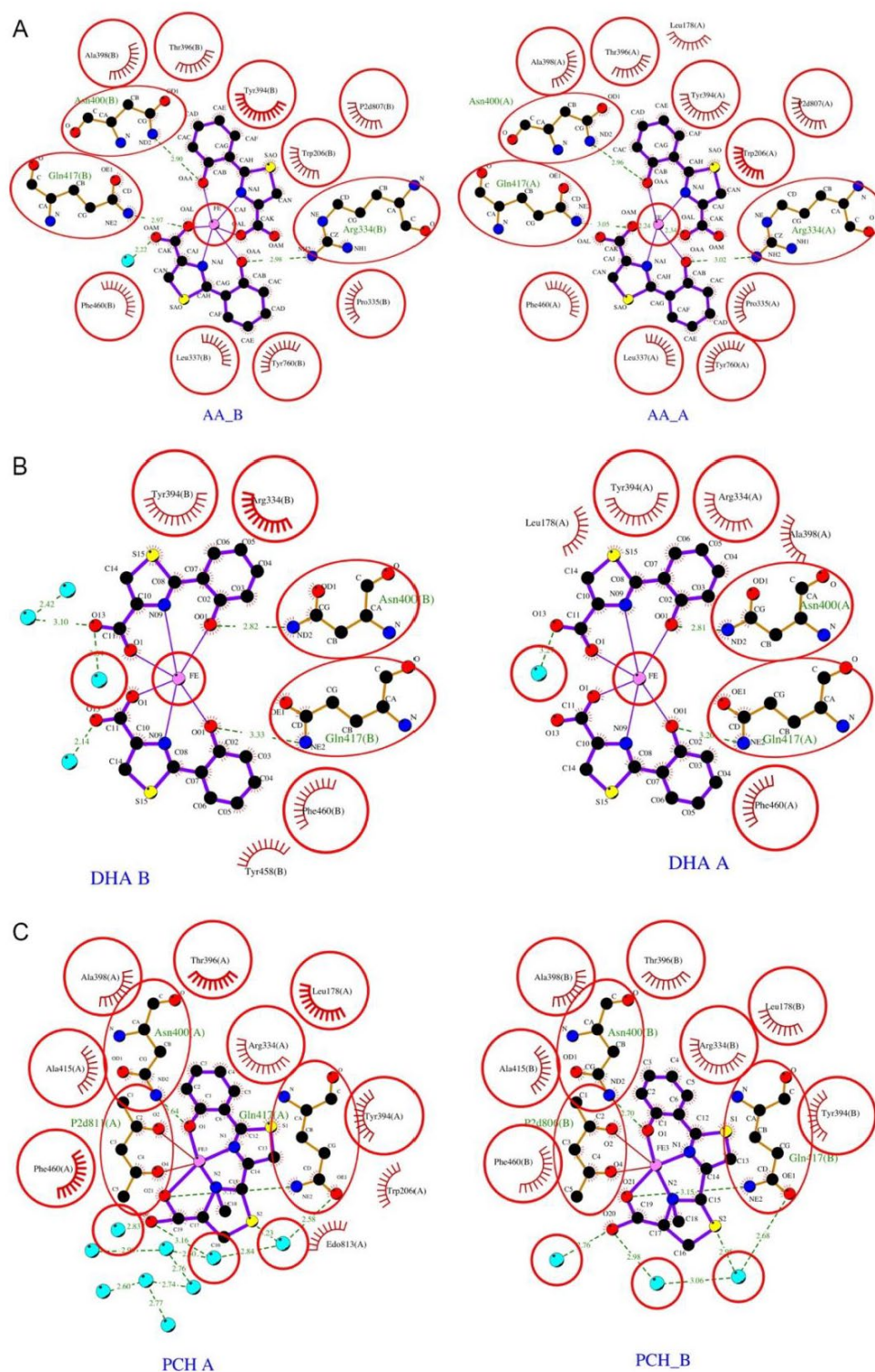


## STRUCTURAL BIOLOGY

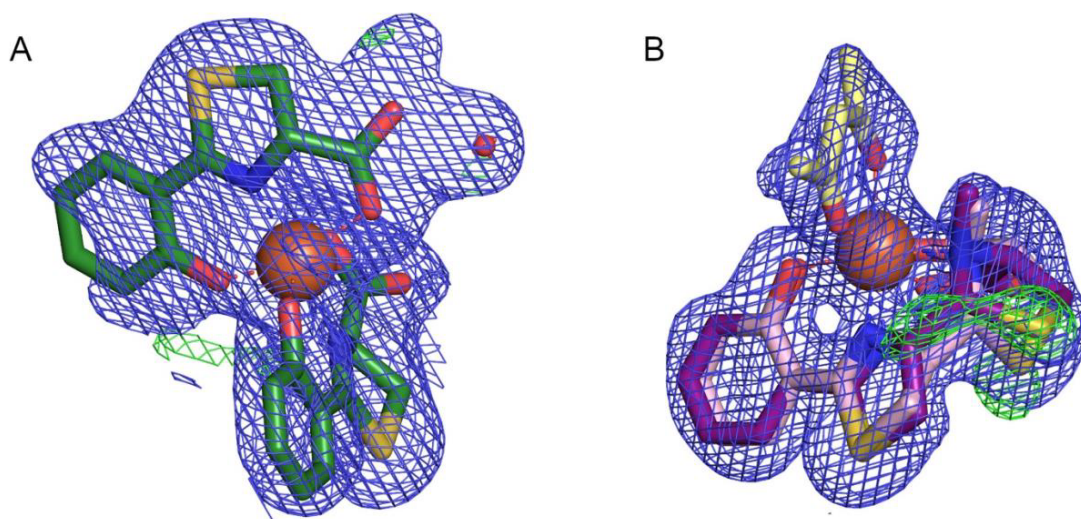
Additional figures



**Figure S24. Electron density maps for AA<sub>2</sub>-Fe (A) and DHA<sub>2</sub>-Fe chain A (B) and PCH-Fe/ neoPCH-Fe (C).** Omit  $F_0-F_C$  maps contoured at  $3\sigma$  (top panel) and final  $2F_0-F_C$  contoured at  $1\sigma$  (bottom panel) around the siderophores are shown in green and blue respectively. Molecules are shown as sticks with carbon atoms coloured in cyan (AA), dark green (DHA), pink (PCH) and purple (Neo-PCH). Nitrogen in dark blue, and oxygen in red.  $Fe^{3+}$  is represented as an orange sphere. In the PCH complex, one acetylacetonate molecule (pale yellow sticks) completes the coordination shell of the iron.

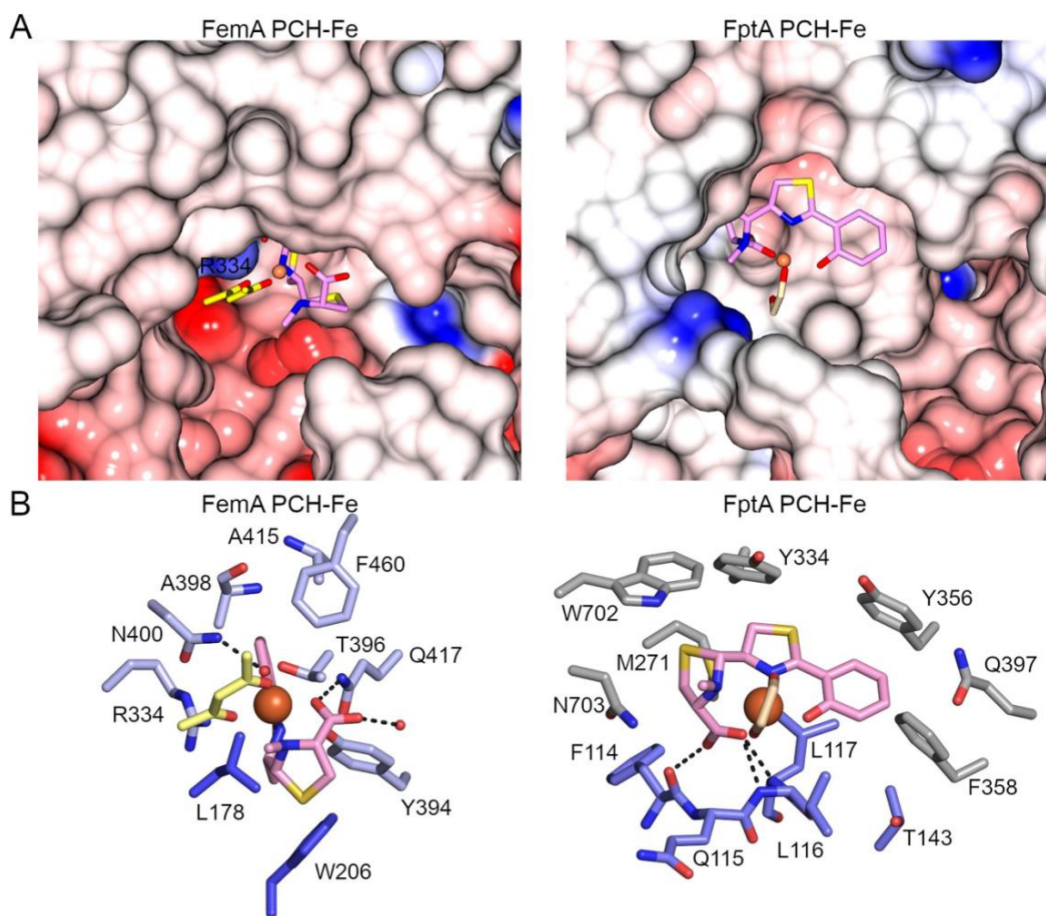


**Figure S25.** Ligplot diagram of the interaction between FemA and AA<sub>2</sub>-Fe (A), DHA<sub>2</sub>-Fe (B), (C) PCH-Fe (for clarity neoPCH-Fe has been removed). Covalent bonds of the siderophores and protein residues are in purple and brown sticks, respectively. Hydrogen bonds are represented by green dashed line and hydrophobic contacts are shown as red semi-circles with radiating spokes.

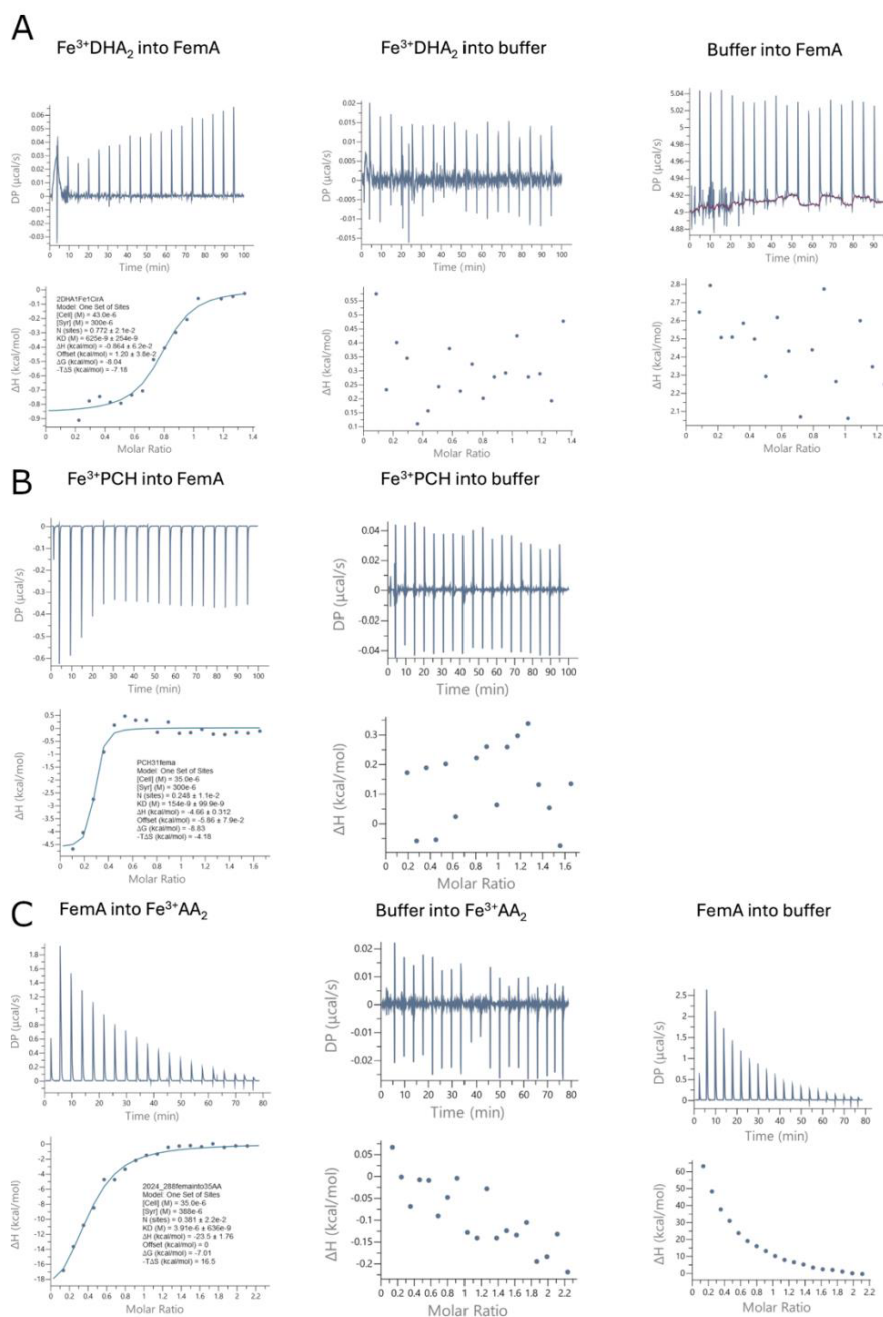


**Figure S26.** **A.** Final 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> (blue) and F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> (green) electron density maps of DHA<sub>2</sub>-Fe in chain B (B) contoured at 1 and 3 σ respectively show that the second molecule which chelates the iron (top molecule) could be a mixture of two conformations which couldn't be modelled. Nitrogen are colored in dark blue, oxygen in red and sulphur in yellow. Fe<sup>3+</sup> is represented as an orange sphere. **B.** 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> (blue) and F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> maps (green) contoured at 1 and 3 σ around PCH (light pink) if only PCH is added to the model before refinement. NeOPCH is shown in purple stick for information. One acetylacetonate molecule (pale yellow sticks) completes the coordination shell of the iron.

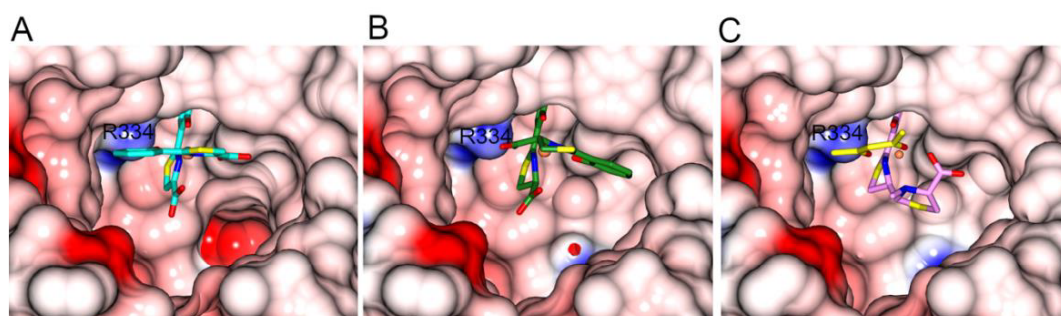




**Figure S27. Comparison of PCH binding between FptA and FemA.** **A** View from the extracellular side of the binding pocket of FemA in complex with PCH-Fe and FptA PCH-Fe.<sup>10</sup> Proteins have been superposed using secondary structures. Proteins are represented as a surface coloured by electrostatic charges calculated in CCP4MG. Positively charged electrostatic potential is coloured blue and negatively charged electrostatic potential is coloured red. For clarity, neoPCH-Fe has been removed in the FemA structure. PCH are shown as sticks with carbon atoms coloured in pink sulphur yellow, nitrogen blue and oxygen red. The Fe<sup>3+</sup> is represented as an orange sphere. One molecule coming from the crystallisation condition, an acetylacetonate in the FemA structure (colored in light yellow) and an ethylene glycol (colored in sand) in the FptA structure, is present in the binding site. **B** Comparison of the binding interactions between FemA and PCH-Fe and FptA and PCH-Fe. Residues of the  $\beta$ -barrel within 4.0 Å of the siderophores are displayed in light blue (FemA) or grey (FptA). Residues of the plug domain are in dark blue. Carbon atoms of PCH are coloured as pink. Hydrogen bonds are shown as black broken lines and Fe<sup>3+</sup> is represented as an orange sphere.



**Fig S28. Isothermal calorimetry titrations of  $\text{Fe}^{3+}\text{-DHA}_2$  into FemA (A),  $\text{Fe}^{3+}\text{-PCH}$  into FemA (B) and FemA into  $\text{Fe}^{3+}\text{-DHA}_2$  (C).** Titration were performed at 10°C in PBS buffer with 0.48 mM n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. Top panel corresponds to the raw titration data and bottom panel to the fitted isotherm after control experiments were subtracted using MicroCal PEAQ-ITC software. The N values reflect inaccuracies in protein and siderophore concentrations due to precipitation. Together with the low enthalpy of the reactions and the effects of protein and siderophore dilution, this prevented accurate determination of binding and thermodynamic parameters.



**Fig S29.** View from the extracellular side of the binding pocket of FemA in complex with AA<sub>2</sub>-Fe (A) DHA<sub>2</sub>-Fe (B) and PCH-Fe (C) represented as a surface coloured by electrostatic charges calculated in CCP4MG. For clarity neoPCH-Fe has been removed. Siderophore are shown as sticks with carbon atoms colored cyan for AA, in green for DHA and pink for PCH. Sulphur yellow, nitrogen blue and oxygen red. The Fe<sup>3+</sup> is represented an orange sphere.

### Crystallographic data and refinement statistics

**Table S4. Crystallographic data and refinement statistics.** Each dataset was collected from a single crystal. \*Values in parenthesis are for highest-resolution shell.

Pdb code	8S34	9EX3	9F2T	9FVQ
ligand	AA	DHA		PCH
Space group	P1	P1	P1	P1
Cell dimensions				
a, b, c (Å)	83.86, 84.88, 86.85	84.94, 86.31,88.29	83.68,84.95, 86.70	83.83, 84.66, 86.97
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90.00, 118.53,113.70	90.01, 61.63, 66.33	89.96,61.59,66.26	89.96,118.66, 113.58
Resolution (Å)	75.47-1.86 (1.86- 1.89)	71.63-2.15 (2.15- 2.18-1.75)	75.55-2.05(2.05- 2.08)	66.72-2.03 (2.03-2.07)
Rsym or Rmerge	0.13 (1.72)	0.14 (0.78)	0.2 (1.3)	0.15 (0.47)
I / $\sigma$ (I)	9.7 (0.6)	10.9 (1.8)	7.1 (1.0)	9.3 (2.2)
Completeness (%)	94.6.5 (61.9)	96.1 (56.2)	98.2 (96.0)	96.6 (74.9)
Redundancy	3.6 (3.2)	3.5 (3.4)	3.6 (3.7)	3.4 (2.8)
CC half	0.995 (0.28)	0.98 (0.71)	0.99 (0.32)	0.98 (0.72)
Refinement				
Resolution (Å)	75.47-1.86	44.07-2.15	75.55-2.2	66.72-2.03
No. reflections	148919	102720	93224	116427
Rwork / Rfree	0.21/0.25	0.23/0.26	0.22-0.27	0.19/0.23
No. atoms				
Macromolecule	10388	10307	10282	10371
Ligands	202	194	133	333)
Solvent	604	606	482	740
B-factors				
Macromolecule	33.3	30.50	32.25	22.77
Ligands	41.59	35.34	39.84	34.52
Solvent	34.23	30.74	32.14	27.10
R.m.s deviations				
Bond lengths (Å)	0.0071	0.009	0.0075	0.015
Bond angles (°)	0.944	0.942	0.919	2.28

## BIBLIOGRAPHY

- (1) Zamri, A.; Abdallah, M. A. An Improved Stereocontrolled Synthesis of Pyochelin, a Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia Cepacia*. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 249–256.
- (2) Youard, Z. A.; Mislin, G. L.; Majcherczyk, P. A.; Schalk, I. J.; Reimann, C. *Pseudomonas fluorescens* CHAO Produces Enantio-Pyochelin, the Optical Antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* Siderophore Pyochelin. *J Biol Chem* **2007**, *282* (49), 35546–35553.
- (3) Hayen, H.; Volmer, D. A. Different Iron-Chelating Properties of Pyochelin Diastereoisomers Revealed by LC/MS. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *385* (3), 606–611. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0443-0>.
- (4) Mislin, G. L. A.; Hoegy, F.; Cobessi, D.; Poole, K.; Rognan, D.; Schalk, I. J. Binding Properties of Pyochelin and Structurally Related Molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **2006**, *357*, 1437–1448.
- (5) Schlegel, K.; Lex, J.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H. The X-Ray Structure of the Pyochelin Fe<sup>3+</sup> Complex. *Z. Naturforsch.C* **2006**, *61* (3–4), 263–266. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-3-418>.
- (6) Schlegel, K.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H. The Stereoisomers of Pyochelin, a Siderophore of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biometals* **2004**, *17* (4), 409–414.
- (7) 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. Catechol Siderophores Repress the Pyochelin Pathway and Activate the Enterobactin Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*: An Opportunity for Siderophore-Antibiotic Conjugates Development. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18* (3), 819–832. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13199>.
- (8) 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.* **2005**, *102* (22), 8006–8011. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503005102>.
- (9) 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. The Complex of Ferric-Enterobactin with Its Transporter from *Pseudomonas aeruginosa* Suggests a Two-Site Model. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 3673. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11508-y>.
- (10) Cobessi, D.; Celia, H.; Pattus, F. Crystal Structure at High Resolution of Ferric-Pyochelin and Its Membrane Receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **2005**, *352* (4), 893–904.





Chapitre III : Est-ce que *P. aeruginosa*  
utilise des xénosidérophores pour  
acquérir le fer en culture en biofilm ?



## 1 Introduction

À ce jour, les recherches sur l'acquisition du fer par les sidérophores en conditions de biofilm se sont principalement concentrées sur les voies endogènes, en particulier celle de la PVD (Banin *et al.*, 2005; Díaz-Pérez *et al.*, 2022). Plus récemment, des travaux ont mis en évidence la production et la sécrétion de sidérophores par *Aspergillus* en réponse à la présence de *P. aeruginosa* dans le cas de co-biofilms (Sass *et al.*, 2019; Bastos *et al.*, 2022). Toutefois, l'utilisation de ces xénosidérophores par *P. aeruginosa* en biofilm n'a, jusqu'à présent, pas été démontrée.

Nous nous sommes donc intéressés à la capacité de *P. aeruginosa* à utiliser des xénosidérophores au cours de la formation du biofilm. Pour cette première étude, notre choix s'est porté sur l'ENT, un sidérophore de type catéchol, et la NOCA, un sidérophore de type hydroxamate. Ces sidérophores ont été choisis car ils sont couramment retrouvés au sein des communautés microbiennes de *P. aeruginosa*. Ils possèdent également des affinités distinctes pour l'ion ferrique ( $pFe = 35,5$  pour l'ENT contre  $pFe$  de  $27,7$  pour la NOCA) (Anderegg *et al.*, 1963b; Loomis and Raymond, 1991). Les voies d'acquisition du fer par l'ENT et la NOCA ont, de plus, largement été caractérisées en conditions planctoniques.

Cette étude étant nouvelle au sein du laboratoire, il a d'abord fallu développer un protocole permettant de visualiser l'expression des voies d'acquisition du fer dans un contexte de culture en biofilm. Notre objectif était de suivre l'expression des voies d'import du fer par les xénosidérophores ENT et NOCA, mais aussi ceux par les sidérophores endogènes, PVD et PCH, pour voir comment leur expression évoluait au cours de la formation du biofilm.

## 2 Résultats

### 2.1 Développement d'un protocole permettant l'étude de l'expression des voies d'import du fer en biofilm chez *P. aeruginosa*

#### 2.1.1 Description des constructions et des rapporteurs fluorescents utilisés

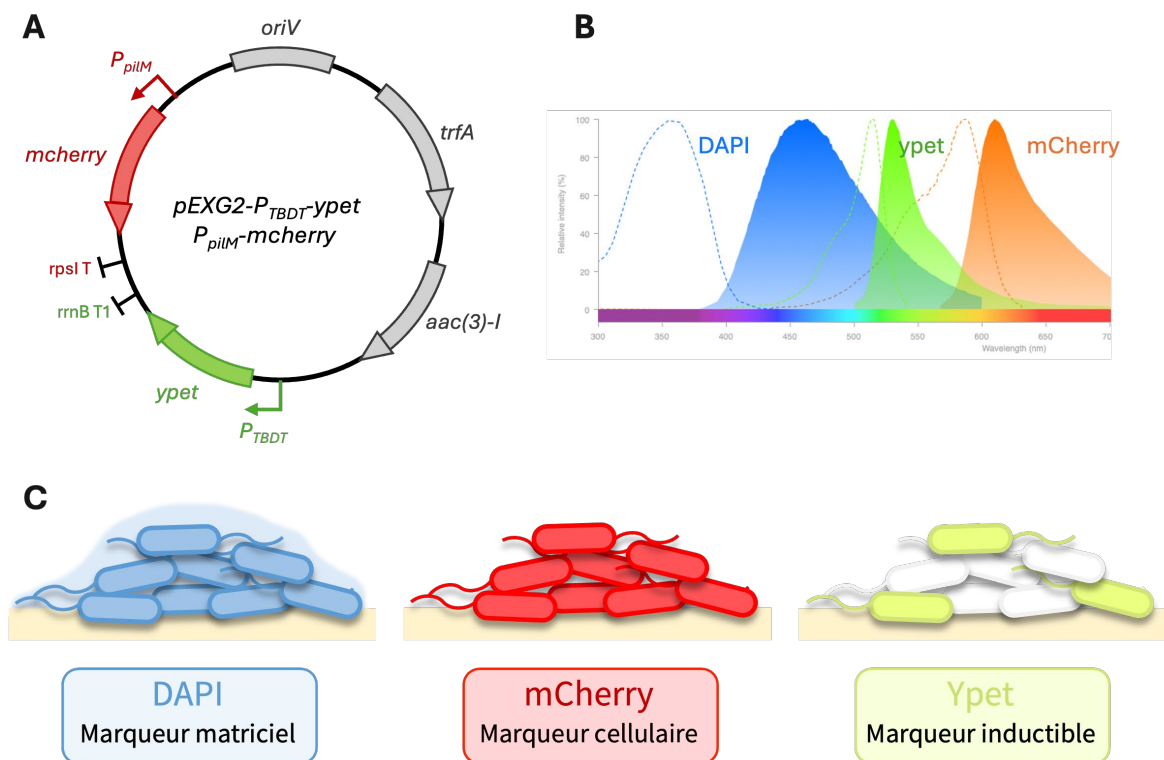
Afin de suivre l'expression des voies d'import du fer au cours de la formation du biofilm, nous avons choisi de suivre l'expression du TBDT. En effet, les gènes impliqués dans une même voie d'acquisition du fer, y compris celui codant pour le TBDT, sont souvent organisés en opéron. Ainsi, le suivi de

l'expression du gène codant pour le TBDT permet de suivre l'expression de la voie. Pour cela, nous avons utilisé des souches rapportrices de *P. aeruginosa* construites au laboratoire par le Dr. Olivier Cunrath. Dans ces souches, les régions promotrices des gènes codants pour les TBDTs FpvA (PVD-Fe), FptA (PCH-Fe), PfeA (ENT-Fe) et FoxA (NOCA-Fe) contrôlent l'expression du gène *ypet*, codant pour la protéine fluorescente Ypet (ex : 500 nm, em : 540 nm) (Figure 60A et B). Étant donné que Ypet rapporte l'expression d'un TBDT, ce système est inductible en fonction des conditions environnementales (Figure 60C).

La région promotrice et le gène *ypet* ont été insérés dans un plasmide auto-répliquatif (pEXG2) portant le gène de résistance à la gentamicine, *aac(3)-I*, ce qui permet le maintien du plasmide par pression de sélection. De plus, la région promotrice du gène *pilM*, codant pour une protéine constitutive impliquée dans la biogenèse des fimbriae de type IV, a également été insérée dans le plasmide, en amont du gène *mCherry*, codant pour la protéine fluorescente mCherry (ex : 587 nm, em : 610 nm), servant de marqueur cellulaire (Figure 60). La présence de ces marqueurs nous permettra de suivre l'expression du TBDT d'intérêt durant la formation du biofilm et de vérifier si son expression est homogène au sein de celui-ci (Figure 60C). Pour notre étude, nous avons utilisé les souches rapportrices PAO1 (*P<sub>fpvA</sub>-ypet*), PAO1 (*P<sub>fptA</sub>-ypet*), PAO1 (*P<sub>foxA</sub>-ypet*) et PAO1 (*P<sub>pfeA</sub>-ypet*) pour suivre respectivement l'expression de FpvA, FptA, FoxA et PfeA. Des études réalisées en conditions planctoniques ont déjà confirmé l'expression constitutive de mCherry dans une culture bactérienne, ainsi que l'induction de l'expression de Ypet en réponse aux conditions environnementales, témoignant de la transcription du gène codant pour le TBDT d'intérêt dans ces conditions (Cianfanelli *et al.*, 2020; Ferry *et al.*, 2024).

Par ailleurs, le développement du biofilm chez *P. aeruginosa* s'accompagne de la production d'une matrice extracellulaire, dont il est également nécessaire de suivre la formation afin de confirmer la mise en place effective d'un biofilm dans nos conditions de culture. Pour cela, nous avons utilisé un troisième marqueur fluorescent, le DAPI (ex : 358 nm, em : 461 nm), un intercalant de l'ADN permettant de marquer à la fois l'ADN intracellulaire et l'ADN extracellulaire (eDNA). Ce dernier constitue l'un des composants de la matrice des biofilms de *P. aeruginosa* et sa détection par le DAPI a déjà été décrite précédemment dans la littérature pour visualiser la structure du biofilm et en évaluer le développement (Whitchurch *et al.*, 2002; Mulcahy *et al.*, 2008). Le DAPI a également été

choisi afin d'éviter tout chevauchement des spectres d'excitation et d'émission avec ceux des fluorochromes utilisés (Ypet et mCherry), ainsi qu'avec la PVD produite par les bactéries (ex : 400 nm, em : 450 nm) (Figure 6oB). En plus de son rôle de marqueur de la matrice, le DAPI permettra de vérifier le maintien du plasmide dans l'ensemble des cellules du biofilm *via* le suivi de l'expression de mCherry. Ainsi, le système mis au point permettra non seulement de suivre l'expression des TBDTs au cours de la formation du biofilm de *P. aeruginosa* mais également d'observer si cette expression est homogène au sein du biofilm (Figure 6oC).



**Figure 6o :** Rapporteurs fluorescents et marqueurs utilisés dans l'étude de l'expression des voies d'import du fer dans les biofilms de *P. aeruginosa*. **A.** Représentation schématique du plasmide rapporteur. Le promoteur variable des TBDTs d'intérêt est cloné en amont de *yPET* et du terminateur *rrnB* ; *P<sub>piIM</sub>mCherry* est suivi du terminateur *rpsL*, *aac(3)-I* confère la résistance à la gentamicine, *oriV* est l'origine de répllication et *trfA* code pour la protéine initiateur de la répllication. **B.** Spectres de fluorescence du DAPI (ex : 358 nm, em : 461 nm), de Ypet (ex : 500 nm, em : 540 nm) et de mCherry (ex : 587 nm, em : 610 nm). **C.** Schéma représentatif du rôle de chaque rapporteur fluorescent au cours de la formation du biofilm.

### 2.1.2 Conditions expérimentales testées

Dans le cadre de la mise au point d'un protocole expérimental visant à suivre l'expression des TBDTs au cours de la formation du biofilm de *P. aeruginosa*, nous avons dans un premier temps adopté des conditions de culture similaires à celles couramment utilisées en condition planctonique. Après une

préculture sur la nuit à 30°C et en milieu riche (LB), les souches rapportrices PAO1 (*P<sub>fpvA</sub>-ypet*), PAO1 (*P<sub>fpIA</sub>-ypet*), PAO1 (*P<sub>foxA</sub>-ypet*) et PAO1 (*P<sub>pfeA</sub>-ypet*) ont été cultivées en milieu CAA, qui est un milieu carencé en fer contenant 20 nM de ce nutriment (Cunrath *et al.*, 2016). Ce milieu favorise l'expression des systèmes d'acquisition du fer *via* les sidérophores (Perraud *et al.*, 2018; Normant *et al.*, 2020; Perraud, Cantero, *et al.*, 2020). Le maintien de ces paramètres permettra de comparer les résultats obtenus dans des conditions de biofilm à ceux déjà observés en conditions planctoniques.

En parallèle, plusieurs paramètres expérimentaux ont été évalués afin d'identifier les conditions optimales de formation du biofilm de *P. aeruginosa* en milieu carencé en fer (CAA). Nous avons d'abord testé différentes conditions d'agitation (statique, 30 rpm, 50 rpm), afin d'évaluer si la modulation de l'oxygénation induite par l'agitation influençait la formation du biofilm. En effet, une précédente étude sur *P. aeruginosa* a montré qu'une agitation modérée (50 rpm) favorise le développement d'un biofilm structuré observable en microscopie confocale (Cai *et al.*, 2020). Ensuite, nous avons évalué l'impact de l'influence de la densité cellulaire initiale de la préculture bactérienne sur la formation du biofilm en démarrant les cultures à différentes densités optiques ( $DO_{600} = 1, 0,1$  et  $0,01$ ). Nous avons également voulu vérifier l'impact de l'ajout de gentamicine, à la fois sur le maintien du plasmide dans les cellules et la formation du biofilm. Enfin, nous avons étudié l'influence du renouvellement du milieu sur le développement du biofilm au cours du temps. L'ensemble des paramètres testés et les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 6**.

**Tableau 6** : Conditions expérimentales testées pour l'optimisation du protocole de formation du biofilm chez *P. aeruginosa*. La formation du biofilm est soulignée en vert lorsqu'elle est fortement favorisée (++) , en jaune lorsqu'elle est modérée (+) et en rouge lorsqu'elle est inhibée (-).

Agitation	Statique	30 rpm	50 rpm
	+	++	+
Densité optique initiale	DO = 0,01	DO = 0,1	DO = 1
	++	+	-
Gentamicine	0 µg/mL	15 µg/mL	30 µg/mL
	++	+	-
Renouvellement du milieu	Aucun	1 fois/jour	2 fois/jour
	+	++	+

Les résultats obtenus ont permis d'identifier les conditions les plus favorables à la formation du biofilm de *P. aeruginosa* en condition de carence en fer. Une faible agitation (30 rpm) s'est révélée

optimale, car elle favorise la formation d'un biofilm avec une production matricielle plus importante par rapport aux conditions statiques ou à 50 rpm. Ce niveau d'agitation limite les flux susceptibles de perturber la formation du biofilm, tout en assurant une meilleure oxygénation du milieu. Concernant la densité cellulaire initiale, une culture démarrée à  $DO_{600} = 0,01$  s'est avérée propice à une formation progressive du biofilm. À cette densité, les bactéries bénéficient d'un temps d'adaptation plus long en milieu carencé en fer, favorisant un développement structuré du biofilm et une expression des voies d'acquisition du fer. En revanche, la présence de gentamicine inhibe la formation du biofilm, sans pour autant sembler nécessaire au maintien du plasmide dans les cellules. Enfin, un renouvellement modéré du milieu (une fois par jour) s'est révélé optimal, permettant d'éviter à la fois un appauvrissement du milieu en nutriments (sans renouvellement du milieu) et la déstabilisation de la structure du biofilm observée avec deux renouvellements par jour. Ainsi, les conditions expérimentales les plus adaptées à l'étude de la formation du biofilm de *P. aeruginosa* en condition de carence en fer sont : une culture initiale à  $DO_{600} = 0,01$ , sous agitation douce (30 rpm), avec un renouvellement du milieu une fois par jour, et en l'absence de gentamicine.

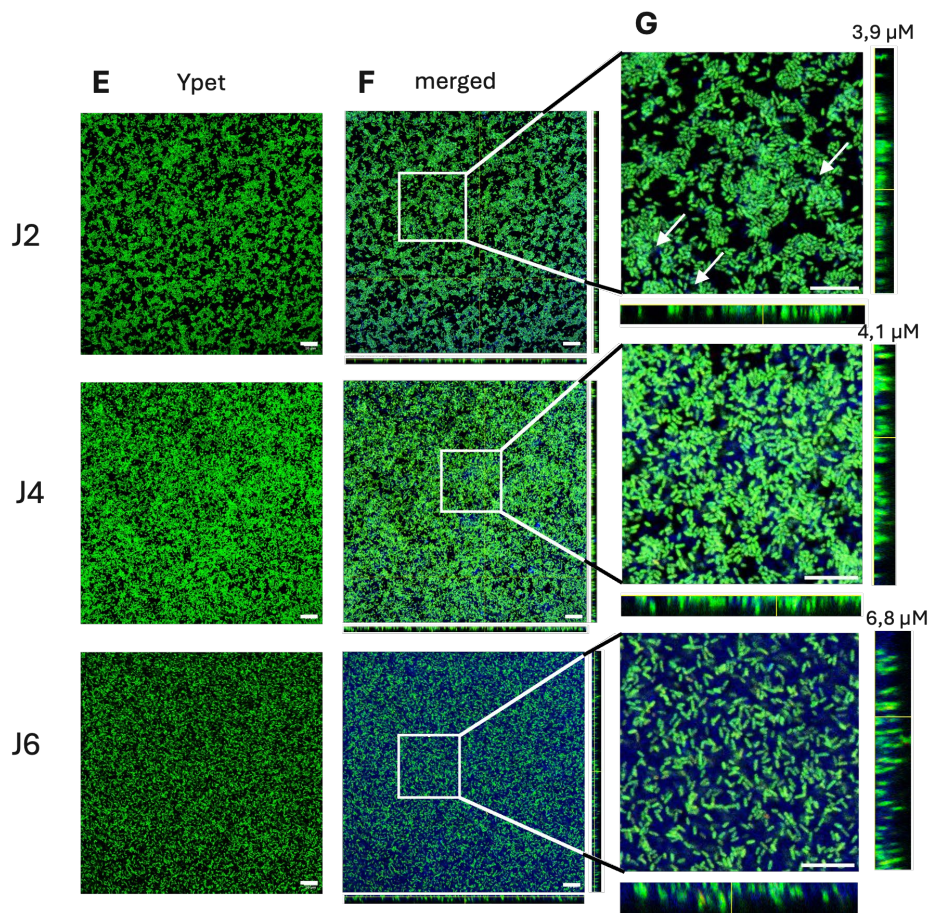
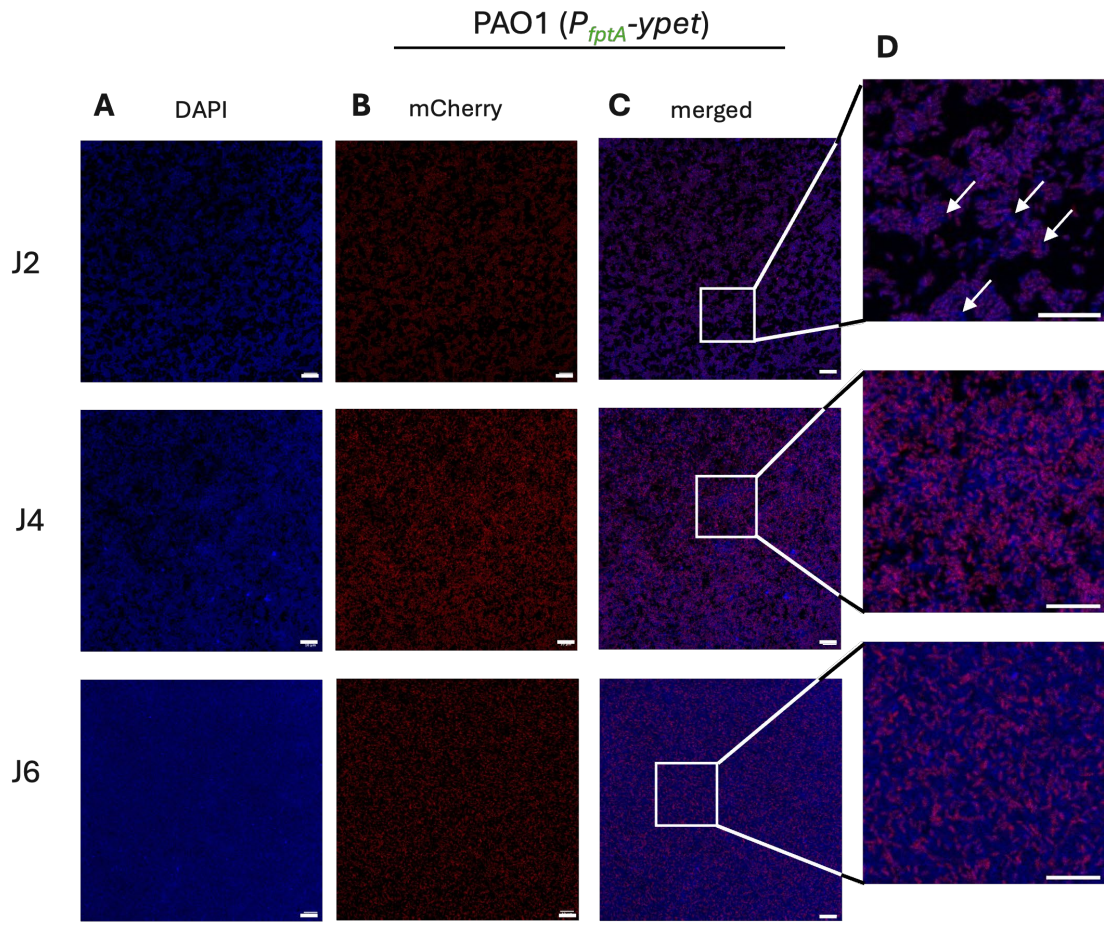
### 2.1.3 Validation du protocole expérimental par microscopie confocale

Dans un second temps, nous avons vérifié que l'expression de mCherry était constitutive et celle de Ypet inducible dans nos conditions expérimentales. Nous avons également souhaité vérifier que les biofilms formés dans ces conditions de culture étaient comparables quelle que soit la souche rapportrice utilisée. Pour ce faire, les souches PAO1 ( $P_{jpvA}$ -ypet), PAO1 ( $P_{jplA}$ -ypet), PAO1 ( $P_{joxA}$ -ypet) et PAO1 ( $P_{jfeA}$ -ypet) ont été cultivées à 30°C en plaque IBIDI 8 puits, selon le protocole détaillé dans la section précédente. Après 2, 4 et 6 jours de culture, les biofilms formés ont été fixés et colorés au DAPI, puis analysés par microscopie confocale à balayage laser (CLSM) en utilisant les paramètres d'acquisition identiques pour toutes les conditions. Cette standardisation permet une comparaison fiable de l'intensité de fluorescence mesurée pour chaque fluorochrome et construction au cours du temps et entre les différents réplicats biologiques. Des coupes d'images en Z (Z stack) ont également été réalisées pour chaque acquisition avec un incrément de 0,3  $\mu$ M, afin de restituer la structure tridimensionnelle du biofilm formé dans nos conditions expérimentales. Les images présentées dans la suite de cette partie correspondent à la position basale en Z du biofilm, c'est-à-dire à la couche bactérienne en contact avec la surface abiotique.



Dans un souci de clarté, les résultats obtenus pour la souche PAO<sub>1</sub>(*P<sub>fp1A</sub>-ypet*) sont décrits en détail ci-dessous (Figure 61), ces observations étant représentatives, pour les fluorochromes DAPI et mCherry, de l'ensemble des constructions utilisées (Figure 62). Il convient de noter que l'ensemble des données de microscopie présentées ici repose, à ce stade, sur une analyse qualitative. Une analyse quantitative, en collaboration avec le plateau technique d'imagerie de l'UPR3572 à Strasbourg, est en cours. Elle permettra de confirmer les observations décrites, en prenant en compte l'ensemble des réplicats biologiques réalisés pour chaque condition expérimentale. Un signal fluorescent est détecté dans le biofilm au cours du temps pour les marqueurs DAPI et mCherry (Figure 61A-B). Le marquage au DAPI révèle, après 2 jours de culture, une fluorescence localisée dans les cellules bactériennes, reconnaissables à leur morphologie de bacilles. Cette fluorescence devient progressivement plus diffuse au cours du temps et n'est plus restreinte aux seules cellules bactériennes (Figure 61A). La diffusion du signal témoigne d'une production croissante de la matrice extracellulaire par les cellules du biofilm, validant l'utilisation du DAPI comme marqueur matriciel du biofilm de *P. aeruginosa*.

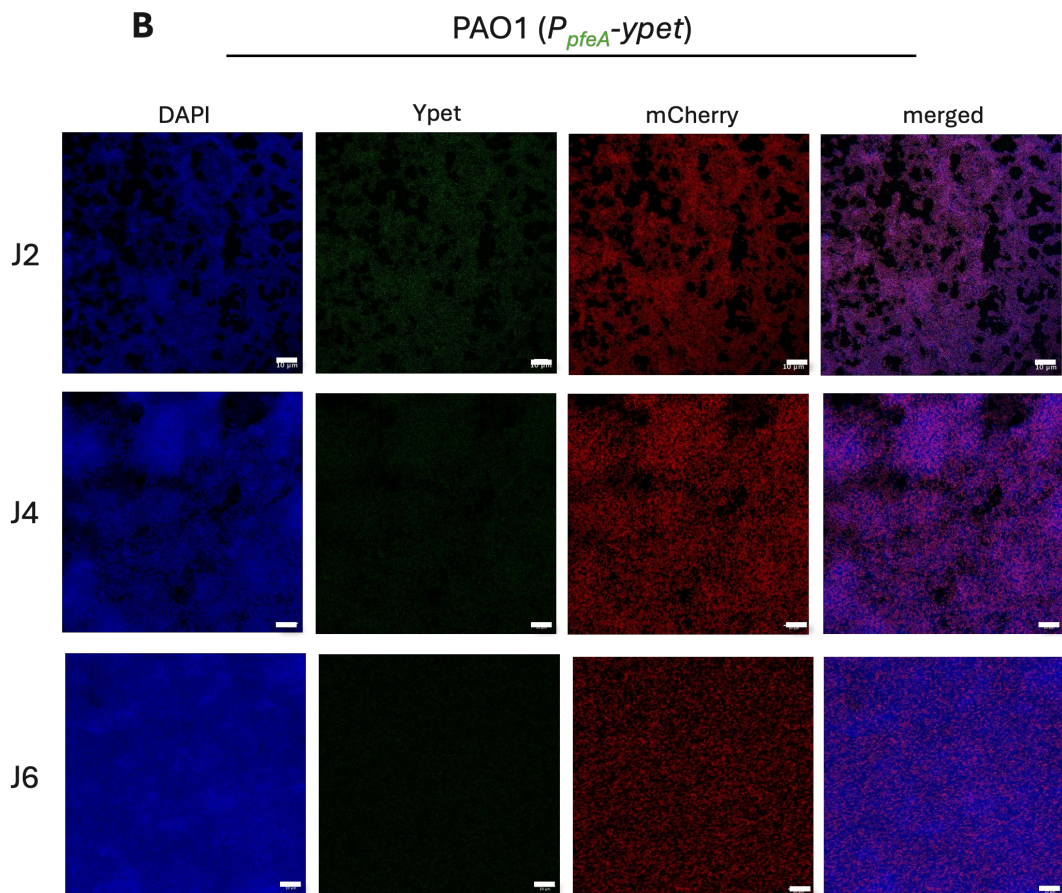
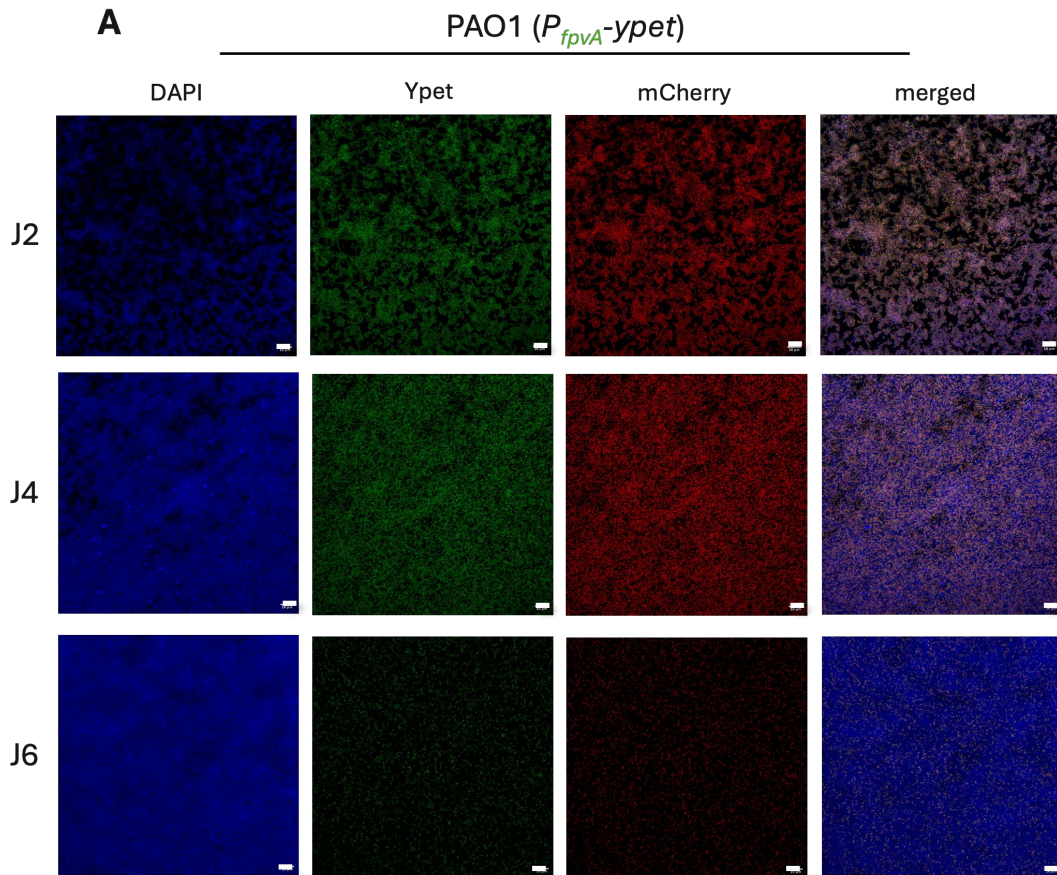
L'analyse de la superposition des signaux mCherry et DAPI (merged, Figure 61C), révèle une colocalisation de ces signaux, apparaissant alors en violet. Cela indique que la majorité des cellules marquées au DAPI exprime mCherry, et donc porte le plasmide. Ces résultats indiquent que mCherry est un marqueur cellulaire constitutif en condition de biofilm. Il est toutefois important de noter la présence de quelques cellules isolées marquées uniquement au DAPI après deux jours de culture, signalées par les flèches blanches (J2, Figure 61D et G). Ces résultats suggèrent soit une perte du plasmide, soit l'absence d'expression constitutive de mCherry dans ces cellules. L'état métabolique de ces cellules sera vérifié ultérieurement par une analyse complémentaire du biofilm basé sur la viabilité cellulaire (kit Live/Dead bactérien).

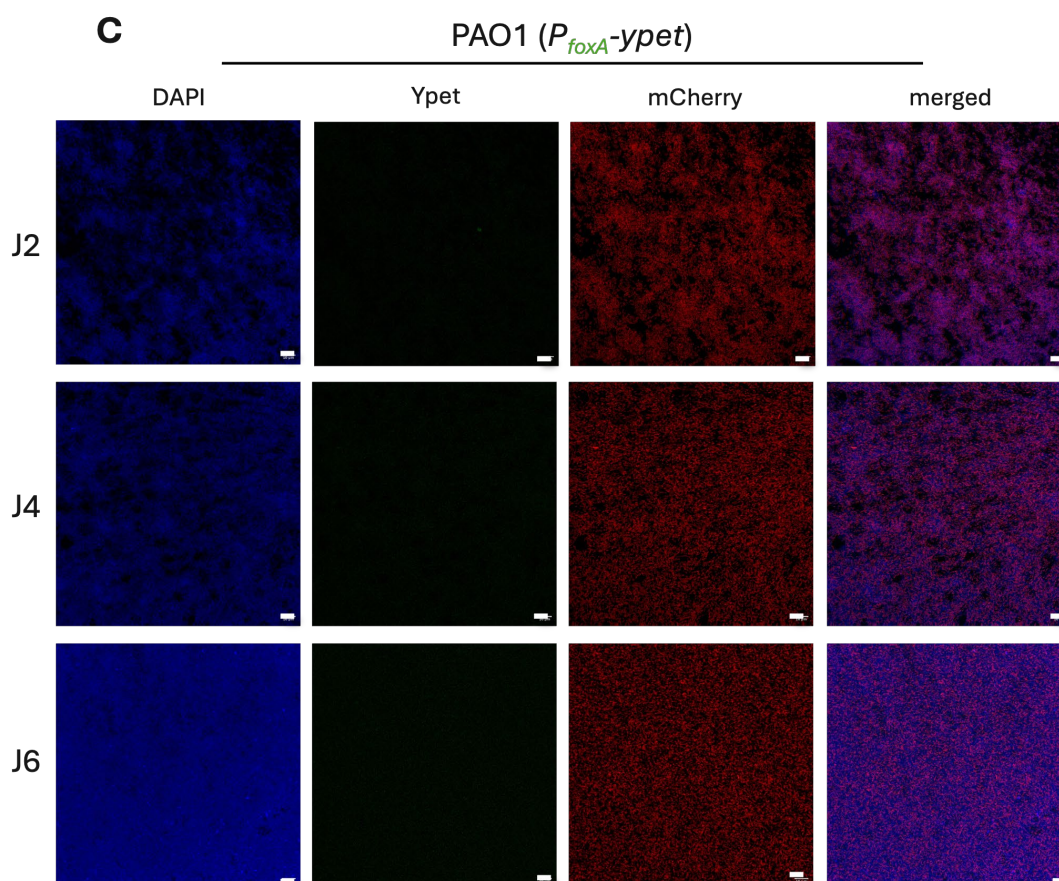


**Figure 61** : Visualisation par microscopie confocale de l'expression des marqueurs fluorescents DAPI, mCherry et Ypet au sein du biofilm de *P. aeruginosa* ( $P_{fptA}$ -*ypet*) après 2, 4 et 6 jours de culture. A. Florescence du DAPI (ex : 358 nm, em : 461 nm) révélant l'ADN cellulaire et extracellulaire ; B. Expression de mCherry (ex : 587 nm, em : 610 nm), servant de marqueur constitutif cellulaire ; C. Superposition des signaux DAPI et mCherry ; D. Agrandissement de la zone superposée ; E. Expression de Ypet (ex : 500 nm, em : 540 nm), rapportant la transcription de *fptA* ; F. Superposition des signaux DAPI, mCherry et Ypet et G. Vue orthogonale agrandie de la superposition présentant l'épaisseur du biofilm formé. Les flèches indiquent la présence de cellules exclusivement marquées au DAPI. Barre d'échelle : 10  $\mu$ M.

Concernant Ypet, un signal fluorescent n'est observé qu'avec les souches PAO1 ( $P_{fptA}$ -*ypet*) et PAO1- ( $P_{fpvA}$ -*ypet*) et ce, après 2, 4 ou 6 jours de culture (Figures 61E et 62A). L'analyse de la superposition des signaux DAPI, mCherry et Ypet révèle une colocalisation de l'ensemble des signaux : ils apparaissent roses dans le cas de FpvA et verts dans le cas de FptA. Cette différence de teinte traduit une variation d'intensité de fluorescence de Ypet entre les deux constructions, qui semble homogène au sein du biofilm et stable au cours du temps (Figure 61F et 62A, colonne merged). Ces observations suggèrent une expression plus importante de *fptA* par rapport à *fpvA*, dans nos conditions expérimentales, ce qui avait déjà été observé en milieu carencé en fer dans des conditions planctoniques (Cunrath *et al.*, 2016). Aucun signal Ypet n'est détecté pour les souches PAO1( $P_{pfeA}$ -*ypet*) et PAO1 ( $P_{foxA}$ -*ypet*) (Figure 62B-C, colonne ypet), indiquant l'absence d'expression de *pfeA* et *foxA* en l'absence d'ENT et de NOCA, comme dans les conditions de culture planctonique (Cunrath *et al.*, 2016).







**Figure 62** : Visualisation par microscopie confocale de l'expression des marqueurs fluorescents DAPI, mCherry et Ypet et de la superposition de l'ensemble des signaux (merged) au sein du biofilm de *P. aeruginosa* après 2, 4 et 6 jours de culture. A. Résultats obtenus dans le cadre de la souche PAO1 ( $P_{fpaA}$ -ypet) B. PAO1 ( $P_{pfeA}$ -ypet) et C. PAO1 ( $P_{foxA}$ -ypet) en l'absence d'ajout exogène de sidérophores. Barre d'échelle : 10  $\mu$ M.

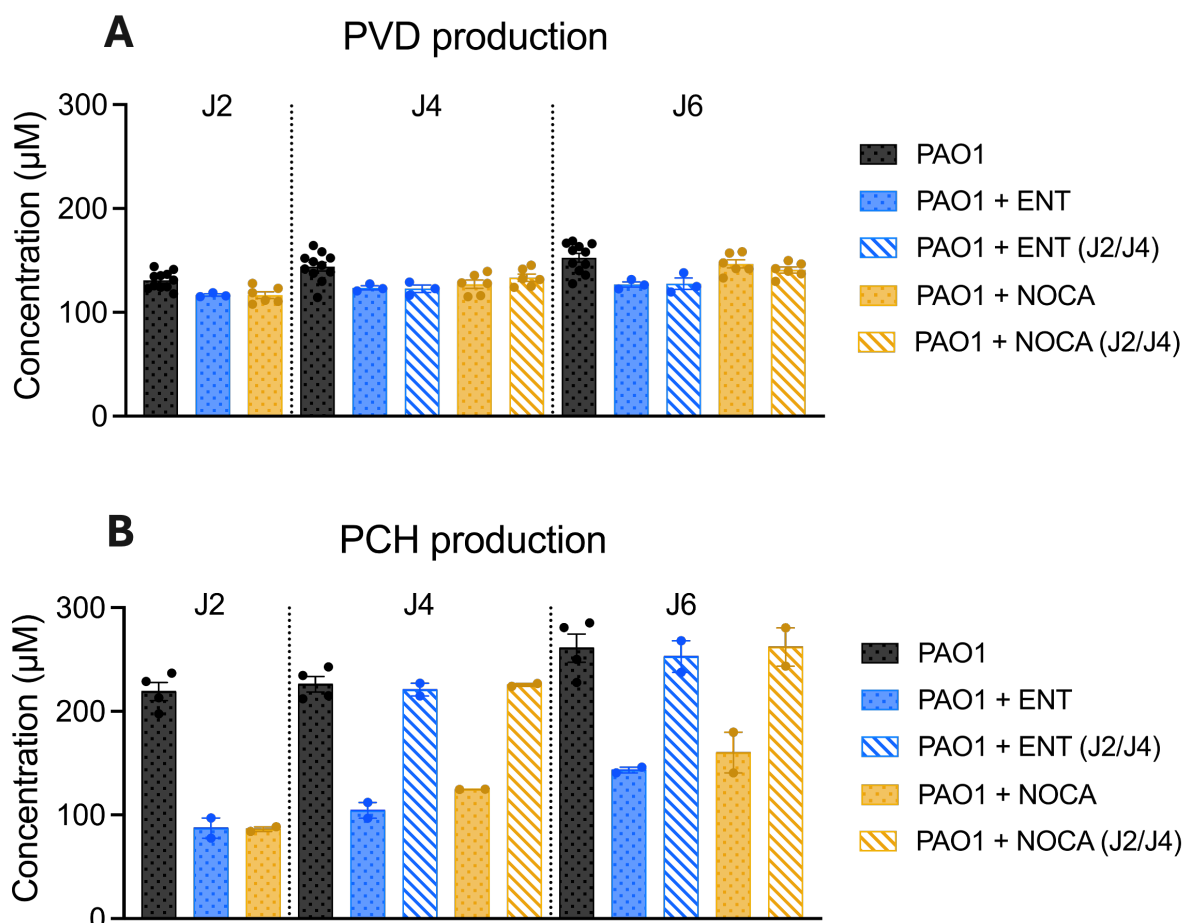
#### 2.1.4 Dosage de la production de PVD et de PCH

L'expression des TBDTs FpvA et FptA observée par microscopie confocale au sein du biofilm, devrait, en théorie, s'accompagner d'une production des sidérophores endogènes PVD et PCH par les bactéries au cours de la formation du biofilm. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié la production de la PVD et la PCH dans les surnageants de cultures de *P. aeruginosa* en biofilm aux différentes étapes de son développement (J2, J4 et J6), en exploitant les propriétés spectrales de ces deux sidérophores : la PVD présente un maximum d'absorbance à 400 nm à pH neutre et la PCH à 310 nm. Les surnageants des cultures ont été récupérés, filtrés, puis analysés par spectrométrie UV-visible. La quantification de la PCH a nécessité une extraction préalable à l'acétate d'éthyle. En raison du volume limité de surnageants disponibles, les mesures ont été réalisées à partir d'un pool de surnageants issus de l'ensemble des souches porteuses des constructions, pour chaque point



temporel. Ce choix est justifié par les données précédentes montrant que les biofilms formés étaient similaires quelle que soit la construction utilisée.

Les résultats obtenus indiquent que la production de la PVD reste stable au cours de la formation du biofilm, avec une concentration moyenne d'environ 140  $\mu\text{M}$  (Figure 63A). Concernant la production de la PCH, sa concentration reste constante aux jours 2 et 4 (moyenne de 222  $\mu\text{M}$ ), mais augmente significativement au jours 6, atteignant une moyenne de 261  $\mu\text{M}$  (Figure 63B). Cette augmentation suggère que la voie PCH joue un rôle plus important à ce stade avancé du biofilm, probablement au stade de maturation I ou II. Il est également intéressant de noter que la concentration en PCH est en moyenne près de 1,6 fois plus élevée que celle de la PVD (Figure 63). Ces données montrent ainsi que *P. aeruginosa* est capable de produire activement ses sidérophores durant la formation du biofilm.



**Figure 63 :** Quantification de la production des sidérophores endogènes dans le surnageant de *P. aeruginosa* en biofilm après 2, 4 et 6 jours de culture. **A.** Concentration en PVD et **B.** concentration en PCH dans le surnageant bactérien. En noir, sans ajout de sidérophores exogènes, en bleu, ajout de 10  $\mu\text{M}$  d'ENT et en orange, ajout de 100  $\mu\text{M}$  de NOCA. Les barres hachurées indiquent un ajout différé des xénosidérophores, réalisé après 2 ou 4 jours de culture, avec observation 48 h après traitement. Pour plus de détails, voir le texte.

### 2.1.5 Description de la structure du biofilm formée dans nos conditions de culture

Les coupes d'images en Z (Z stack) réalisées par microscopie confocale pour l'ensemble des biofilms ont permis d'obtenir leur structure tridimensionnelle dans nos conditions de culture. Bien que seules les données correspondant à la souche PAO1 (*P<sub>fp1A</sub>-ypet*) soient représentées ici (Figure 61G), elles sont représentatives du type de biofilm observé pour l'ensemble des constructions. Les valeurs moyennes de l'épaisseur maximale en Z obtenues pour chaque souche sont renseignées dans le Tableau 7.

**Tableau 7 :** Épaisseur maximale du biofilm formé par *P. aeruginosa* au cours du temps pour chaque construction fluorescente utilisée. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour trois réplicats biologiques.

Temps	Constructions utilisées			
	PAO1 ( <i>P<sub>fp1A</sub>-ypet</i> )	PAO1 ( <i>P<sub>fpvA</sub>-ypet</i> )	PAO1 ( <i>P<sub>pfeA</sub>-ypet</i> )	PAO1 ( <i>P<sub>foxA</sub>-ypet</i> )
2 jours	3,9 +/- 0,3 µM	4 +/- 1,1 µM	4,5 +/- 0,5 µM	3,4 +/- 0,2 µM
4 jours	4,4 +/- 0,6 µM	5,3 +/- 0,2 µM	5,6 +/- 0,4 µM	5,4 +/- 0,4 µM
6 jours	7,7 +/- 0,9 µM	7,4 +/- 0,4 µM	7,7 +/- 0,3 µM	6,8 +/- 1 µM

La superposition des signaux DAPI, mCherry et Ypet dans la souche PAO1 (*P<sub>fp1A</sub>-ypet*) révèle, après 6 jours de culture, un biofilm plat et homogène d'environ 8 µM d'épaisseur recouvrant uniformément l'ensemble de la surface (Figure 61G). De plus, chaque temps de culture semble correspondre à une étape clé de la formation du biofilm. À J2, la colocalisation des trois signaux au niveau des cellules en forme de bacille, sans diffusion du DAPI, indique l'absence de matrice. Les cellules forment une mono- ou bicouche sporadique d'environ 4 µM d'épaisseur, correspondant à la phase d'adhésion primaire (Figure 61G, Tableau 7). À J4, la diffusion partielle du signal DAPI dans certaines zones du biofilm par rapport à Ypet et mCherry indique le début de la production de matrice. Les cellules couvrent presque toute la surface en une bicouche d'environ 5 µM d'épaisseur, suggérant qu'il s'agisse de l'étape de maturation I du biofilm (Figure 61G, Tableau 7). À J6, la diffusion du signal DAPI sur l'ensemble de la surface autour des signaux cellulaires (Ypet et mCherry) indique la présence d'une matrice abondante. Le biofilm atteint une épaisseur d'environ 7 µM, formant une tri-, voir une quadricouche cellulaire en fonction des zones, caractéristique de la maturation II du biofilm (Figure

61G, Tableau 7). Une analyse quantitative reste nécessaire pour prendre en compte l'hétérogénéité d'épaisseur observée, les valeurs actuelles ne représentant que les épaisseurs maximales du biofilm (Tableau 7). De plus, une quantification de la matrice formée par coloration au cristal violet devra être réalisée pour valider les différentes étapes décrites. Ces données, bien que qualitatives, montrent que nos conditions expérimentales mises au point sont adaptées à l'étude de l'expression des TBDTs pendant la formation du biofilm.

## 2.2 Expression des voies d'import du fer dans les biofilms de *P. aeruginosa* en présence de xénosidérophores

### 2.2.1 Ajout des xénosidérophores en début de culture

Nous avons ensuite évalué l'impact de l'ajout de xénosidérophores sur l'expression des voies d'acquisition du fer au cours de la formation du biofilm chez *P. aeruginosa*. L'objectif était de déterminer, au cours du temps, si les bactéries du biofilm utilisent ces sidérophores exogènes pour importer du fer en exprimant les TBDTs correspondants, et si cette expression se fait au détriment de l'utilisation des voies endogènes. Nous avons comparé l'effet sur le biofilm de deux familles de sidérophores : les catéchols (ENT) et les hydroxamates (NOCA), qui diffèrent par leur affinité pour l'ion ferrique et par les TBDTs impliqués dans leur import lorsqu'ils sont en complexe avec le fer (Dean and Poole, 1993; Normant *et al.*, 2020). Pour cela, des biofilms ont été cultivés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, avec l'ajout initial puis quotidien de 10  $\mu\text{M}$  d'ENT ou de 100  $\mu\text{M}$  de NOCA. Ces concentrations correspondent à celles induisant une expression maximale de *pfeA* et de *foxA* en condition planctonique (Hubert *et al.*, 2023). L'ajout quotidien d'ENT et de NOCA visait à maintenir leur concentration constante tout au long du développement du biofilm, mimant la production continue de sidérophores par des microorganismes présents dans l'environnement. Après 2, 4 et 6 jours de culture, les biofilms ont été analysés par microscopie confocale en utilisant les mêmes paramètres d'acquisition afin d'assurer la comparabilité des résultats.

Les résultats présentés ci-après se concentrent sur la variation d'intensité de fluorescence de Ypet, marqueur de l'induction transcriptionnelle du gène codant pour le TBDT d'intérêt. Dans nos conditions, seul ce signal varie selon l'addition ou non de xénosidérophores ; les signaux mCherry et



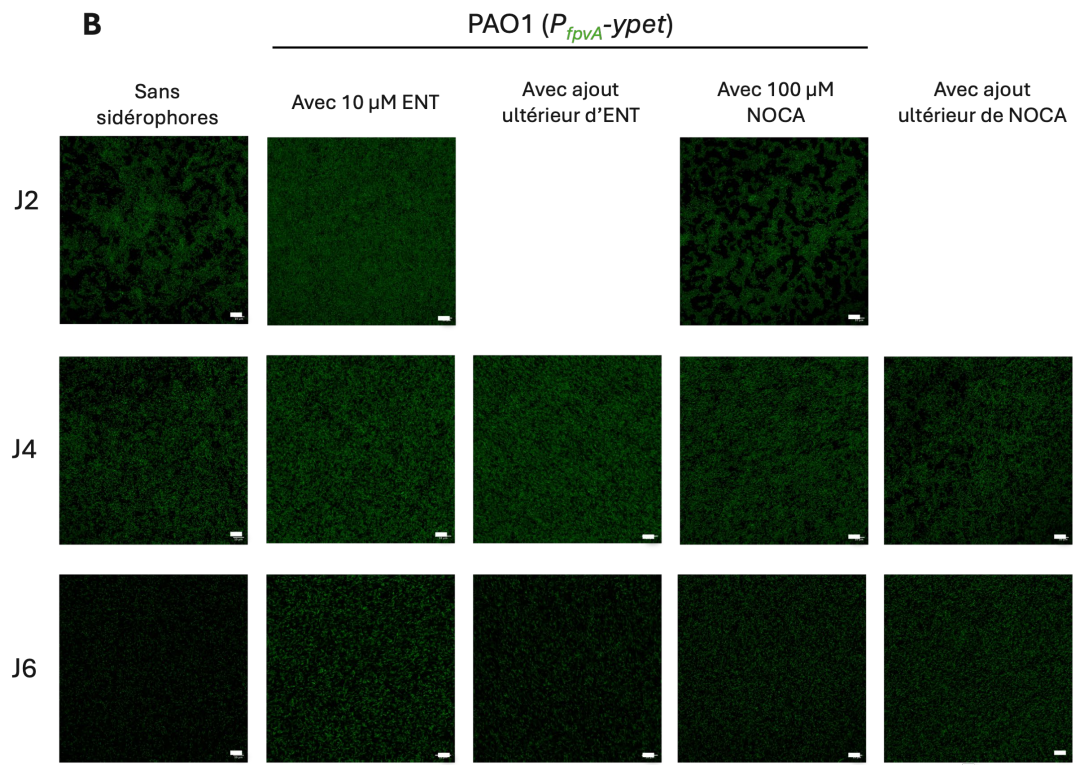
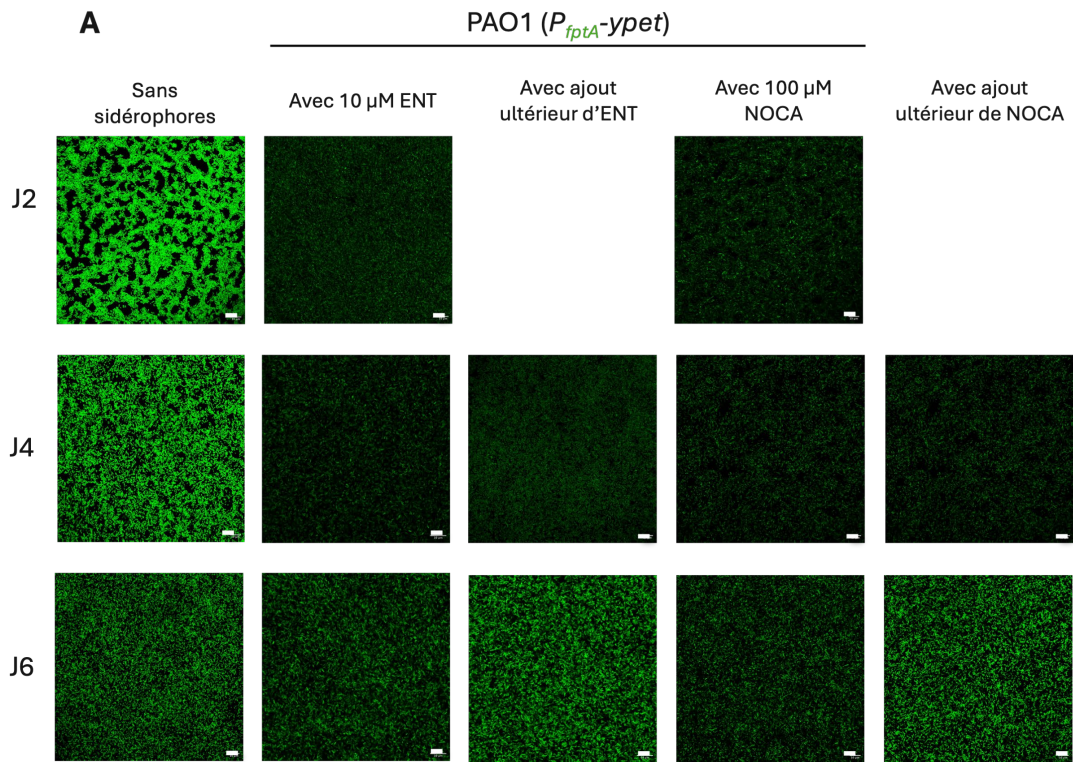
DAPI sont constants, et sont disponibles en matériel supplémentaire suivant cette section (Figures S1–S4, pp. 272-277). Après deux jours de culture, l'ajout de 10  $\mu$ M d'ENT conduit, chez la souche PAO1 ( $P_{fptA}$ -*ypet*), à une forte diminution du signal Ypet sur l'ensemble du biofilm, que ce soit au niveau des bactéries localisées en surface ou plus en profondeur du biofilm (Figure 64A). Ces résultats indiquent qu'en présence d'ENT, l'expression de Ypet et donc de *fptA* est réprimée. En revanche, le signal Ypet reste inchangé chez la souche PAO1 ( $P_{fpvA}$ -*ypet*), suggérant une absence d'effet de l'ENT sur l'expression de *fpvA*, le TBDT de la voie d'import *via* la PVD (Figure 64B). Pour la souche PAO1 ( $P_{pfeA}$ -*ypet*), qui permet de suivre l'expression du TBDT de la ferri-ENT, la présence d'ENT conduit à un signal fluorescent important et homogène au niveau de toutes les cellules du biofilm, correspondant à une forte expression de *pfeA* dès le jour 2 (Figure 64C). Toutefois, ce signal s'atténue au fil du temps, tandis que le signal Ypet associé à *fptA* augmente progressivement (Figure 64A et C). Ce basculement suggère que *P. aeruginosa* utilise l'ENT pour accéder au fer au début de la formation du biofilm, mais y recourt de moins en moins à mesure que le biofilm s'épaissit, probablement en raison d'une difficulté de l'ENT à diffuser dans la matrice du biofilm.

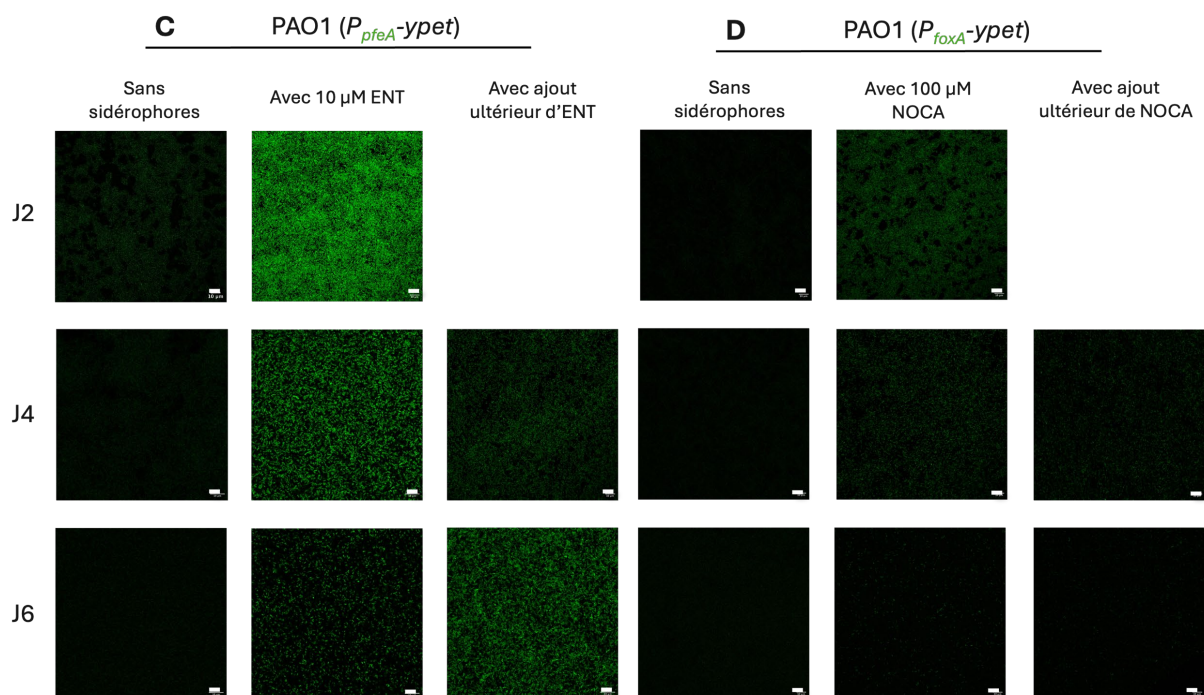
De manière similaire, l'ajout de 100  $\mu$ M de NOCA entraîne une diminution du signal Ypet pour le biofilm obtenu avec la souche PAO1 ( $P_{fptA}$ -*ypet*) dès 2 jours de culture, indiquant une répression de l'expression de *fptA* (Figure 64A). En revanche, l'expression de *fpvA* n'est pas modifiée par la présence de NOCA, comme en témoigne le signal Ypet constant observé pour les biofilms de la souche PAO1 ( $P_{fpvA}$ -*ypet*) (Figure 64B). Pour *foxA*, une induction de son expression est détectée à partir de 2 jours de culture, mais le signal Ypet s'éteint progressivement pour disparaître totalement après 6 jours de culture (Figure 64D), indiquant une répression de l'expression de *foxA*.

Il est intéressant de noter que l'intensité de fluorescence Ypet observée dans les biofilms de la souche PAO1 ( $P_{foxA}$ -*ypet*) cultivés en présence de NOCA est plus faible que celle mesurée dans les biofilms de la souche PAO1 ( $P_{pfeA}$ -*ypet*) en présence d'ENT. Cette observation suggère une expression plus importante de *pfeA* que de *foxA* aux premiers stades de formation du biofilm. Parallèlement, l'expression de *fptA* augmente progressivement au cours du temps, comme observé avec l'ajout d'ENT, ce qui reflète une préférence croissante de *P. aeruginosa* pour l'utilisation de la PCH plutôt que de la NOCA pour accéder au fer.

Nous avons également quantifié la production de la PVD et la PCH dans les surnageants des cultures de *P. aeruginosa* en biofilm en présence d'ENT ou de NOCA. Les résultats montrent que malgré la présence d'ENT (Figure 63, barres en bleu) ou de NOCA (Figure 63, barres en orange) dans le surnageant bactérien, la concentration en PVD demeure stable, avec une moyenne comprise entre 120 et 130  $\mu\text{M}$  au cours du temps (Figure 63A). Ces données sont en accord avec les observations de microscopie et témoignent du rôle majeur de la voie PVD dans le développement du biofilm de *P. aeruginosa*. En revanche, la production de PCH est largement inhibée par la présence d'ENT ou de NOCA (60 % d'inhibition) : la production de PCH passe de 217  $\mu\text{M}$  à 87  $\mu\text{M}$  en présence des xénosidérophores après deux jours de culture du biofilm (Figure 63B). Même si la production de PCH reste toujours inhibée par la présence des xénosidérophores, la concentration en PCH tend à augmenter au cours du temps jusqu'à atteindre une concentration d'environ 150  $\mu\text{M}$  après 6 jours de culture du biofilm (45 % d'inhibition) (Figure 63B). Cette tendance observée dans le cas des deux xénosidérophores est en accord avec les observations de microscopie où une augmentation progressive de l'expression de *FptA* est observée au cours du temps.

Ainsi, l'ajout de xénosidérophores (ENT ou NOCA) module l'expression de certains TBDTs chez *P. aeruginosa* au sein du biofilm et de manière différente selon le stade de formation du biofilm. L'ENT induit fortement l'expression de *pfeA* en début de culture, tandis que celle de *fptA* est réprimée avant de s'activer progressivement, suggérant un changement de stratégie d'acquisition du fer au cours du développement du biofilm. De manière similaire, la NOCA induit l'expression de *foxA* de manière transitoire, suivie d'une induction croissante de l'expression de *fptA*. Parallèlement, la production de PCH est fortement inhibée par ces composés en début de culture du biofilm, tandis que la synthèse de PVD reste stable, confirmant le rôle central de cette voie dans la physiologie du biofilm. Ces observations suggèrent que *P. aeruginosa* adapte dynamiquement l'expression de ses systèmes d'acquisition du fer en réponse à la présence de sidérophores exogènes et aux contraintes liées à la croissance en biofilm.





**Figure 64 :** Visualisation par microscopie confocale de la fluorescence de Ypet au sein du biofilm de *P. aeruginosa* après 2, 4 et 6 jours de culture. A. Résultats obtenus dans le cadre de la souche PAO1 ( $P_{pfeA}$ -ypet) B. PAO1 ( $P_{jpvA}$ -ypet) C. PAO1 ( $P_{pfeA}$ -ypet) et D. PAO1 ( $P_{foxA}$ -ypet) cultivée en absence ou en présence de 10 µM d'ENT ou 100 µM de NOCA. Barre d'échelle : 10 µM.

### 2.2.2 Ajout différé des xénosidérophores sur un biofilm préformé

Enfin, nous avons souhaité évaluer l'effet de l'ajout différé des xénosidérophores sur l'expression des voies d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* au sein du biofilm. Ces données permettront de déterminer si la capacité à utiliser les sidérophores ENT et NOCA dépend du stade de développement du biofilm et donc de la présence ou non de la matrice. Pour cela, les biofilms ont été cultivés dans les mêmes conditions expérimentales que décrites précédemment, puis les xénosidérophores (ENT à 10 µM et NOCA à 100 µM) ont été ajoutés soit après 2 jours, soit après 4 jours de formation du biofilm. Ces temps de culture ont été choisis car ils correspondent à deux étapes distinctes de la formation du biofilm : l'adhésion (J2) et la maturation du biofilm (J4). L'analyse par microscopie confocale a été réalisée 48 h après l'ajout du xénosidérophore en utilisant les mêmes paramètres d'acquisition pour observer la variation d'expression des TBDTs en réponse à la présence du xénosidérophore testé.



L'ajout d'ENT aux jours J2 ou J4 induit une fluorescence Ypet dans les biofilms de la souche PAO1 (*P<sub>pfeA</sub>-ypet*) dans toutes les couches du biofilm (Figure 64C), bien que cette fluorescence semble moins intense que celle observée lorsque l'ENT est ajoutée dès le début de la culture. Cela suggère que *pfeA* reste exprimé en présence d'ENT, quel que soit le stade de développement du biofilm où l'ENT est ajoutée. Une quantification du signal fluorescent est toutefois nécessaire pour confirmer cette différence d'intensité et l'évaluer précisément. Ces résultats indiquent que *P. aeruginosa* peut utiliser l'ENT pour l'acquisition du fer à tous les stades de croissance, probablement en raison de sa forte affinité pour le fer ferrique. Ils montrent également que l'ENT est capable de diffuser, au moins partiellement, dans la matrice du biofilm, ce qui nuance l'hypothèse formulée précédemment. En revanche, l'ajout de NOCA aux jours J2 ou J4 ne permet plus de détecter de signal Ypet dans les biofilms de la souche PAO1 (*P<sub>foxA</sub>-ypet*), suggérant que *foxA* n'est plus exprimé dans ces conditions (Figure 64D). Cela pourrait s'expliquer par la faible affinité de la NOCA pour le fer et/ou sa mauvaise diffusion dans la matrice du biofilm.

Les images confocales révèlent par ailleurs que l'ajout d'ENT ou de NOCA à J2 entraîne une répression du signal Ypet dans les biofilms de la souche PAO1 (*P<sub>fptA</sub>-ypet*) à J4, comparable à celle observée lorsque les xénosidérophores sont ajoutés dès le départ. En revanche, si les composés sont ajoutés à J4, le signal Ypet reste équivalent à celui des biofilms non cultivés en présence de xénosidérophores à J6 (Figure 64A). Ces données indiquent que la répression de *fptA* n'est effective que lorsque les xénosidérophores sont présents dès les premières étapes du développement du biofilm, probablement avant l'établissement de la matrice. Enfin, l'expression de *fpvA* reste inchangée, quelle que soit la présence ou le moment d'ajout des xénosidérophores (Figure 64B), y compris pour l'ENT, pourtant doté d'une affinité supérieure pour le fer par rapport à la PVD. Cela confirme que la transcription de *fpvA* est stable tout au long du développement du biofilm. Concernant la production de sidérophores endogènes, l'ajout d'ENT ou de NOCA à J2 ou J4 n'affecte ni la production de PVD (Figure 63A), ni celle de PCH lorsque l'ajout a lieu à J4 (Figure 63B). Cela suggère qu'un ajout tardif de xénosidérophores ne suffit plus à inhiber la production de PCH, la bactérie privilégiant alors l'usage de ses propres sidérophores pour l'acquisition du fer.

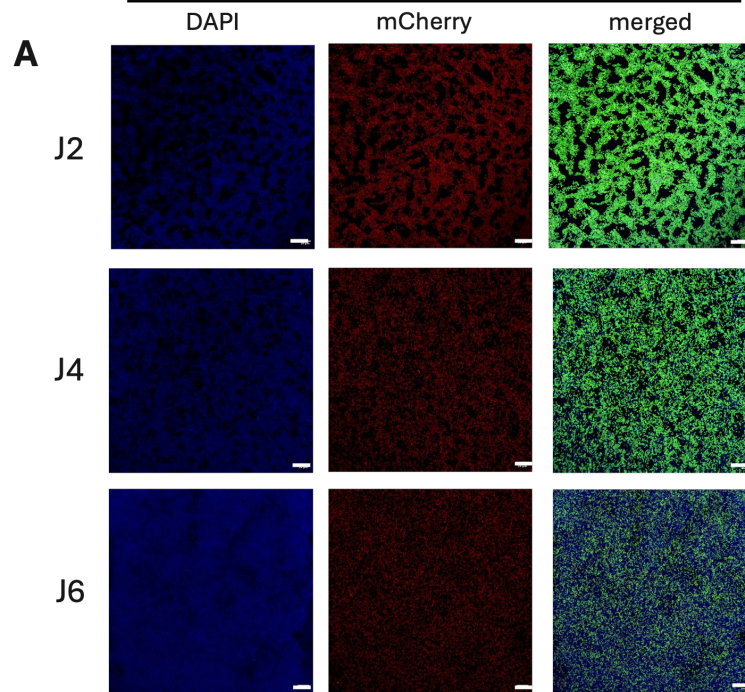
L'ensemble de ces données de fluorescence concernant les rapporteurs fluorescents PAO1 ( $P_{fpvA}$ -*ypet*), PAO1 ( $P_{fplA}$ -*ypet*), PAO1 ( $P_{foxA}$ -*ypet*) et PAO1 ( $P_{pfeA}$ -*ypet*) devront être confirmées par une analyse quantitative des données mais également par qRT-PCR.

Ces résultats montrent que l'efficacité des xénosidérophores à moduler l'expression des TBDTs dépend à la fois de leur nature chimique, leur affinité pour le fer et du stade de développement du biofilm. L'ENT reste fonctionnelle même lorsqu'elle est ajoutée tardivement, induisant l'expression de *pfeA* et réprimant *fptA*, ce qui peut s'expliquer par sa grande affinité pour le fer, mais implique aussi que ce xénosidérophore diffuse un minimum dans la matrice du biofilm. En revanche, la NOCA n'induit plus d'expression de *foxA*, ceci peut être dû à son affinité plus faible pour le fer mais suggère également une capacité à diffuser dans le biofilm plus faible. En effet, la NOCA ayant une affinité pour le fer meilleure que la PCH, sa présence devrait affecter l'expression de *fptA* si ce xénosidérophore pouvait diffuser librement dans le biofilm. Ainsi, que ce soit pour l'ENT ou la NOCA, le développement de la matrice du biofilm semble limiter la diffusion des xénosidérophores dans le biofilm. Enfin, *fpvA* reste exprimé de manière constante en présence ou en absence de xénosidérophores et peu importe le moment où les xénosidérophores sont ajoutés à la culture. La production de sidérophores endogènes n'est altérée que lorsque les xénosidérophores sont présents dès les premières étapes de la formation du biofilm.

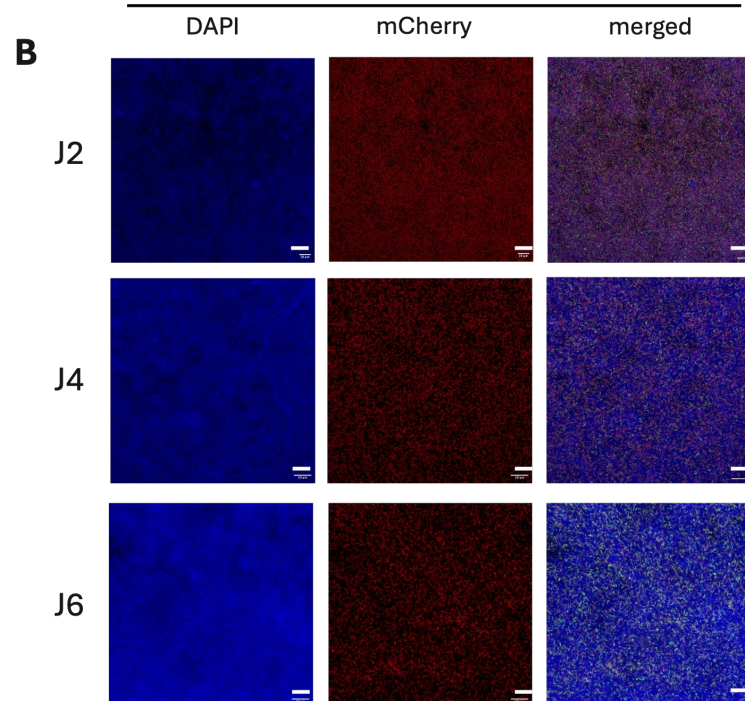
# MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

PAO1 (*P<sub>fptA</sub>-ypet*)

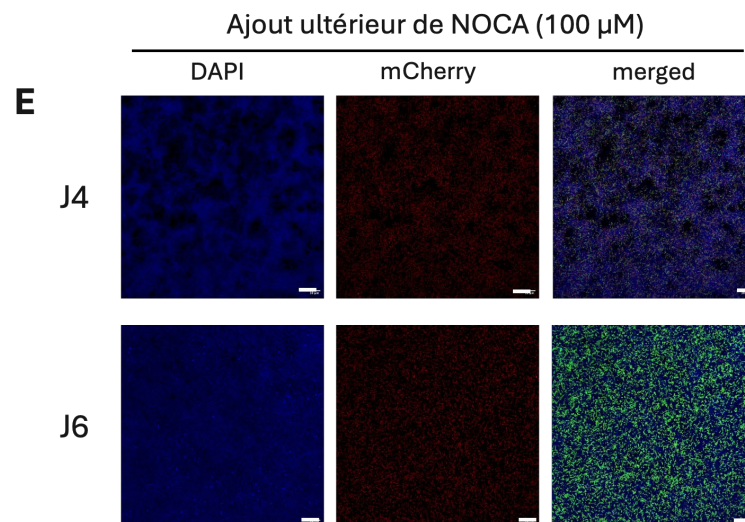
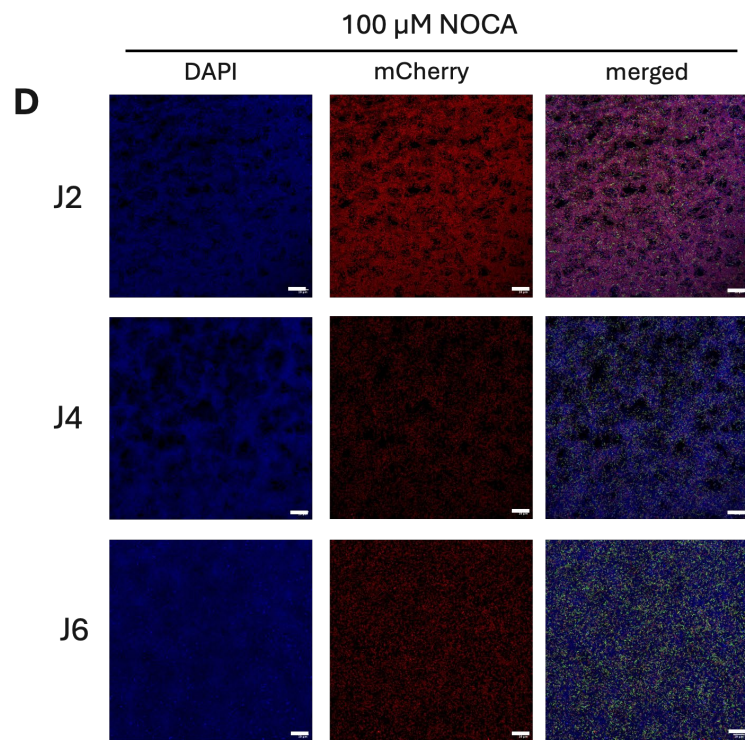
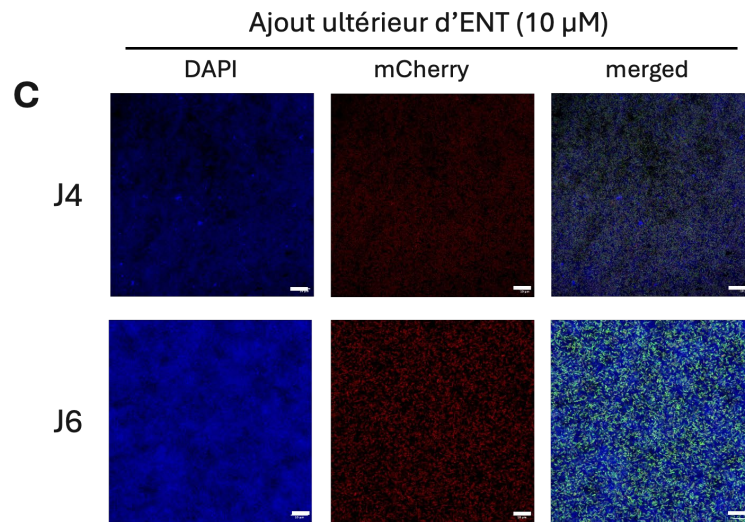
Sans ajout exogène de sidérophores



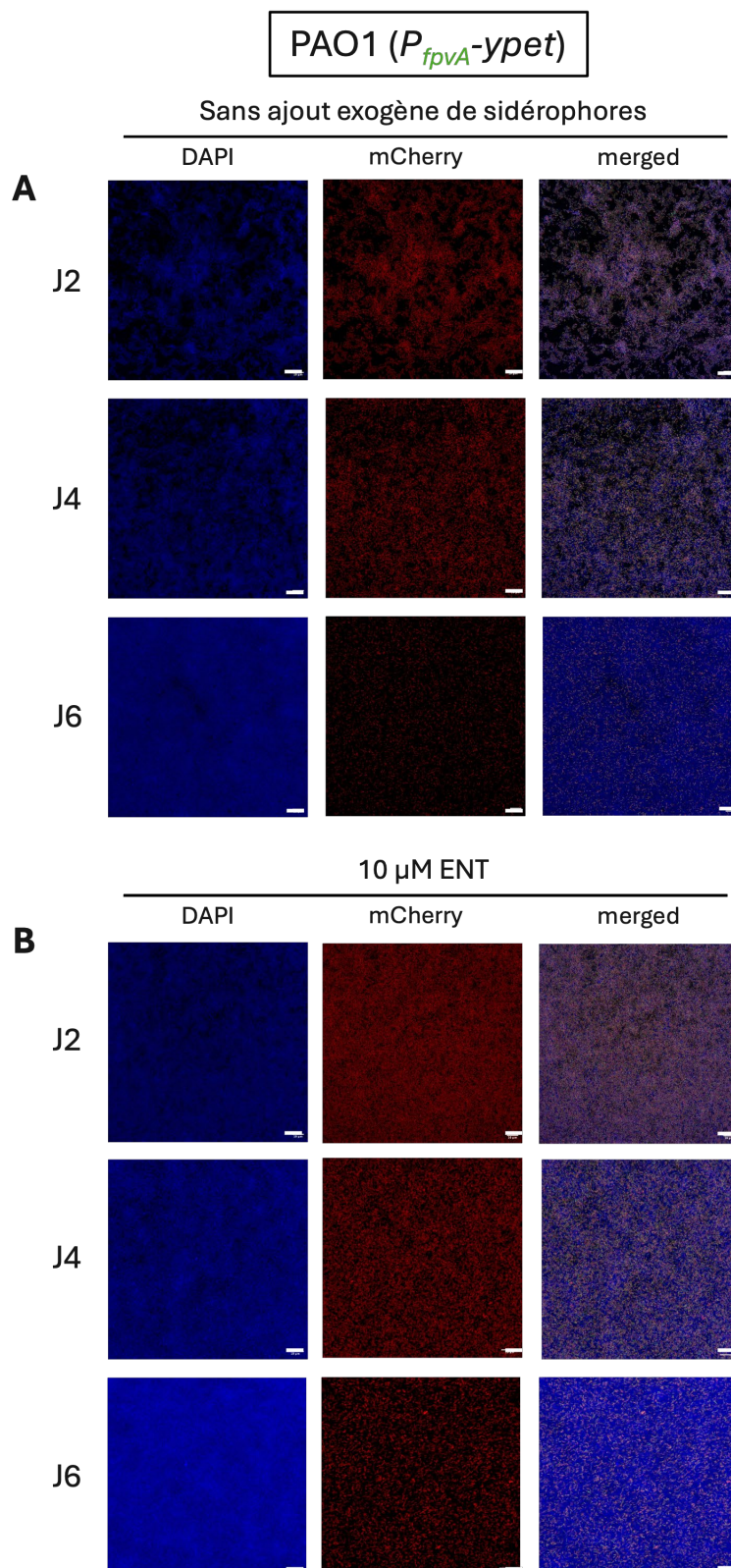
10  $\mu$ M ENT



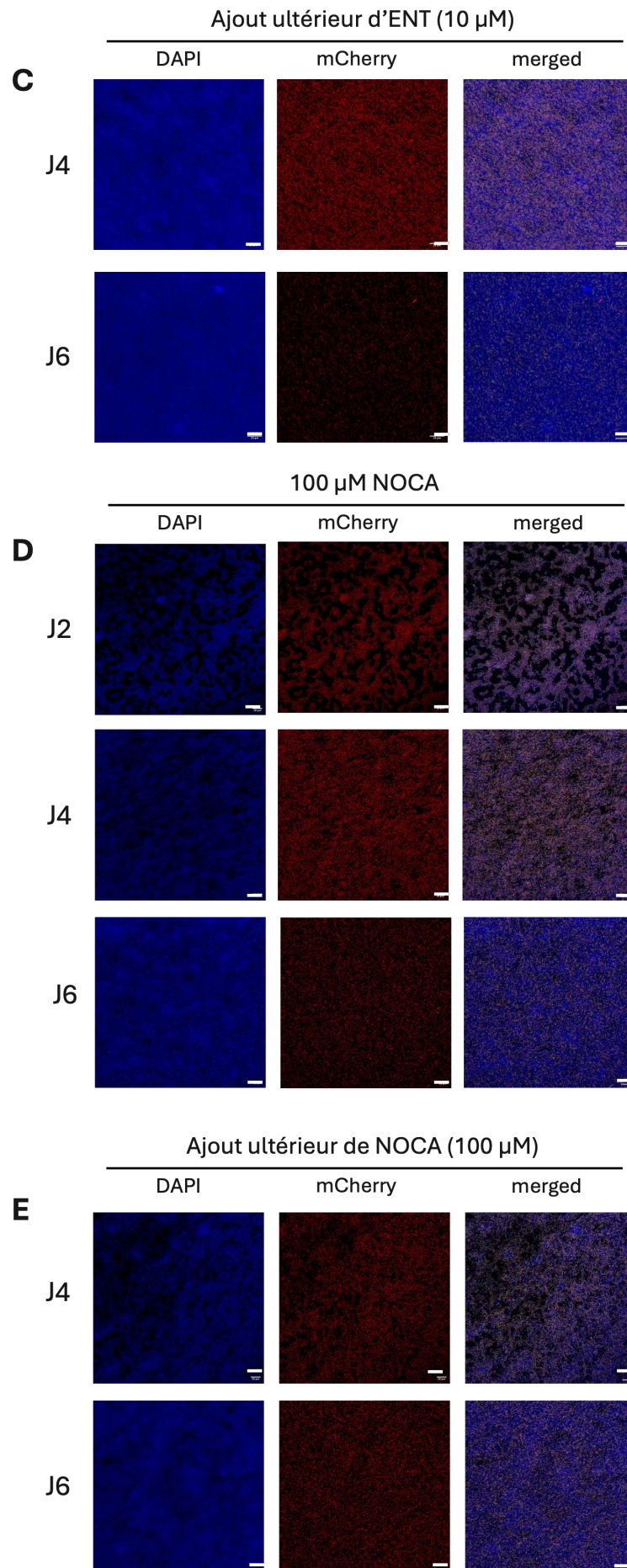




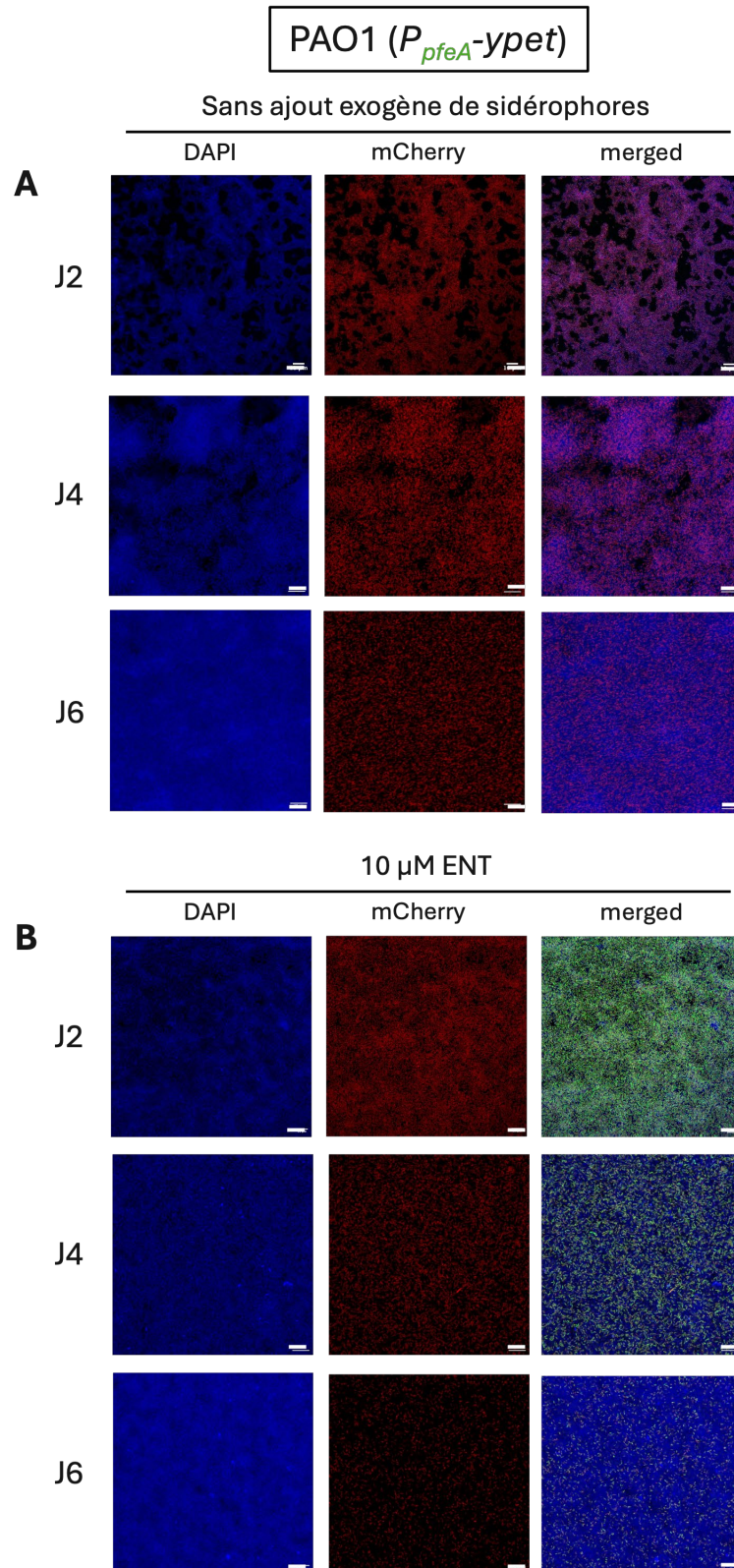
**Figure S1** : Visualisation par microscopie confocale de l'expression des marqueurs fluorescents DAPI, mCherry et de la superposition des signaux DAPI, mCherry et Ypet (merged) au sein du biofilm de *P. aeruginosa* après 2, 4 et 6 jours de culture pour la souche PAO1 ( $P_{fpvA}$ -y $pet$ ). **A**. Absence de xénosidérophores ; **B et D** : Présence des xénosidérophores ENT ou NOCA et **C et E** : Ajout différé des xénosidérophores après 2 ou 4 jours de culture, avec observation 48 h après traitement. Barre d'échelle : 10  $\mu$ M.

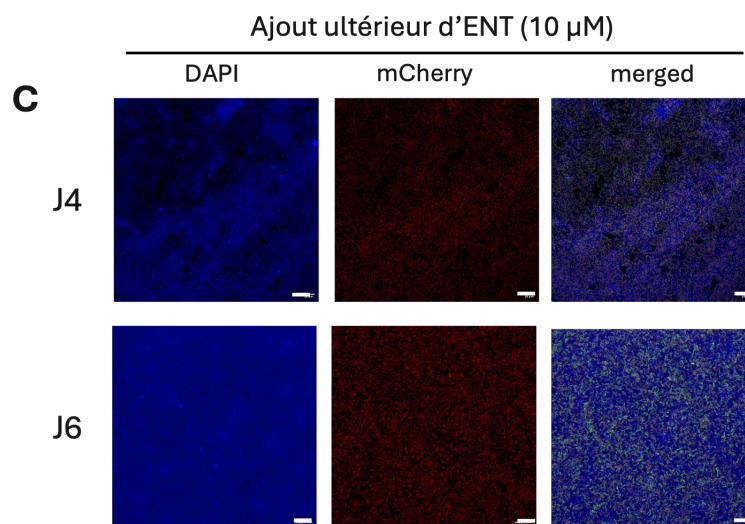






**Figure S2** : Visualisation par microscopie confocale de l'expression des marqueurs fluorescents DAPI, mCherry et de la superposition des signaux DAPI, mCherry et Ypet (merged) au sein du biofilm de *P. aeruginosa* après 2, 4 et 6 jours de culture pour la souche PAO1 (*P<sub>pfeA</sub>-ypet*). **A**. Absence de xénosidérophores ; **B et D** : Présence des xénosidérophores ENT ou NOCA et **C et E** : Ajout différé des xénosidérophores après 2 ou 4 jours de culture, avec observation 48 h après traitement. Barre d'échelle : 10  $\mu$ M.





**Figure S3** : Visualisation par microscopie confocale de l'expression des marqueurs fluorescents DAPI, mCherry et de la superposition des signaux DAPI, mCherry et Ypet (merged) au sein du biofilm de *P. aeruginosa* après 2, 4 et 6 jours de culture pour la souche PAO1 (*P<sub>pfeA</sub>-ypet*). **A** : Absence de xénosidérophores ; **B** : Présence de 10  $\mu$ M d'ENT et **C** : Ajout différé de 10  $\mu$ M d'ENT après 2 ou 4 jours de culture, avec observation 48 h après traitement. Barre d'échelle : 10  $\mu$ M.



PARTIE III : DISCUSSION  
GÉNÉRALE & CONCLUSION





## 1 Acquisition du fer *via* les xénosidérophores et les chélateurs synthétiques en condition de culture planctonique

Les sidérophores peuvent être classés en quatre familles selon la nature de leur groupement chélateur : catéchols, hydroxamates, acides carboxyliques et sidérophores mixtes, ces derniers contenant au moins deux groupements chélateurs différents. Au cours de mon travail de thèse, l'étude des divers xénosidérophores a permis de mieux caractériser la spécificité de reconnaissance de plusieurs TBDTs de *P. aeruginosa*. En particulier, FpvB s'est révélé capable de transporter l'ensemble des sidérophores de type hydroxamate testés, révélant une large plasticité de reconnaissance et de transport. Cette faible sélectivité de liaison suggère que FpvB pourrait également importer le fer *via* d'autres sidérophores de type hydroxamate présents dans la nature (Figure 65). Ces résultats viennent compléter les connaissances sur FpvB, initialement décrit comme transporteur alternatif de la PVD, mais désormais également impliqué dans le transport des complexes ferriques du ferrichrome et de la DFOB (Ghysels *et al.*, 2004; Chan and Burrows, 2022). De plus, une modélisation structurale par AlphaFold2, combinée à des études de docking et de mutagenèse dirigée, suggère que ces différents ligands se lient tous dans une même poche hydrophobe du transporteur (Chan and Burrows, 2022).

Nos résultats montrent également que FiuA reconnaît spécifiquement les sidérophores de type ferrichrome, contenant un motif hexapeptide cyclique (Figure 65), tels que le ferrichrome, la ferrichrysine et la ferricrocine (Hannauer *et al.*, 2010; Chan and Burrows, 2022). Ce motif semble jouer un rôle central dans l'interaction du complexe ferri-sidérophore avec le site de liaison de FiuA. Une certaine variabilité dans la séquence du cycle est néanmoins tolérée, comme en témoignent les séquences Gly-Gly-Gly-Orn-Orn-Orn (ferrichrome), Gly-Gly-Ser-Orn-Orn-Orn (ferricrocine) et Gly-Ser-Ser-Orn-Orn-Orn (ferrichrysine), toutes reconnues et transportées par FiuA. La structure aux rayons X de la ferri-ferrichrysine révèle une coordination de l'ion ferrique dans une configuration octaédrique cis- $\Lambda$ , similaire à celle observée pour le ferrichrome, ce qui explique leur reconnaissance par FiuA (Norrestam *et al.*, 1975). En revanche, des modifications des résidus N-hydroxyornithyl, comme observées pour la ferrirubine et la ferrirhodine, perturbent leur liaison à

FiuA sans impacter celle avec FpvB. Par ailleurs, FiuA reconnaît également la ferri-RHODO dont la stœchiométrie de coordination du fer est de 3 : 1, suggérant un mode de liaison différent à FiuA.

FoxA est impliqué dans l'import des desferrioxamines (DFOG, DFOB, nocardamine / DFOE, bisucabérine), indépendamment de la nature linéaire ou cyclique du sidérophore (Figure 65) (Normant *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2023). Dans ce cas, la reconnaissance semble être principalement déterminée par la structure tridimensionnelle du complexe ferri-sidérophore. Les structures cristallographiques de FoxA liant la ferri-DFOB ou la ferri-NOCA montrent une superposition parfaite des deux complexes ferriques au sein du site de liaison du TBDT, avec une stœchiométrie de 1 : 1 (sidérophore : Fe), suggérant que la DFOG pourrait avoir un mode de liaison similaire (Josts *et al.*, 2019; Normant *et al.*, 2020). Les constantes de dissociation mesurées des complexes ferriques pour FoxA sont également proches ( $K_d \approx 100-180$  nM) (Normant *et al.*, 2020). La bisucabérine forme, quant à elle, un complexe ferrique de stœchiométrie de 3 : 2, en adoptant une conformation mimant celle de la ferri-NOCA, mais en établissant des interactions hydrogènes distinctes avec le site de liaison de FoxA. Néanmoins, la boucle L8 de FoxA reste impliquée dans la reconnaissance du complexe (Chan *et al.*, 2023).

Ces observations corroborent l'étude réalisée avec les analogues synthétiques de la NOCA montrant que seul le composé FoxE 2-5 est uniquement reconnu par FoxA, probablement en raison de sa structure très proche de celle de la NOCA, suggérant un mode de liaison identique au niveau du site de reconnaissance. Bien que ces analogues synthétiques de la NOCA conservent leur capacité à chélater le fer (Mular *et al.*, 2021), leur reconnaissance par un TBDT dépend fortement de la taille et de la conformation du macrocycle. Nos expériences ont révélé que les composés FoxE 2-2, FoxE 2-3 et FoxE 2-4 ne sont pas reconnus par un TBDT chez *P. aeruginosa*. Au contraire, FoxE 2-6 et FoxE 3-5, qui diffèrent à la fois par leur groupement chélateur et leur hydrophobicité, sont reconnus par FoxA et FpvB. Notamment, FoxE 3-5, plus hydrophile, présente une meilleure capacité à transporter le fer dans les cellules de *P. aeruginosa*.

Il est également important de noter que l'antibiotique thiocilline, bien que structurellement distinct des desferrioxamines, est transporté par FoxA. Des approches de docking suggèrent qu'il adopte un mode de liaison similaire à celui de la ferri-NOCA (Chan and Burrows, 2022; Chan *et al.*, 2023). Par ailleurs, nos données montrent que les complexes ferri-fusigène et ferri-coprogène sont uniquement

transportés par FpvB et non par FoxA, probablement par la présence d'insaturations dans leurs chaînes carbonées, rigidifiant leur structure et déstabilisant leur interaction avec FoxA.

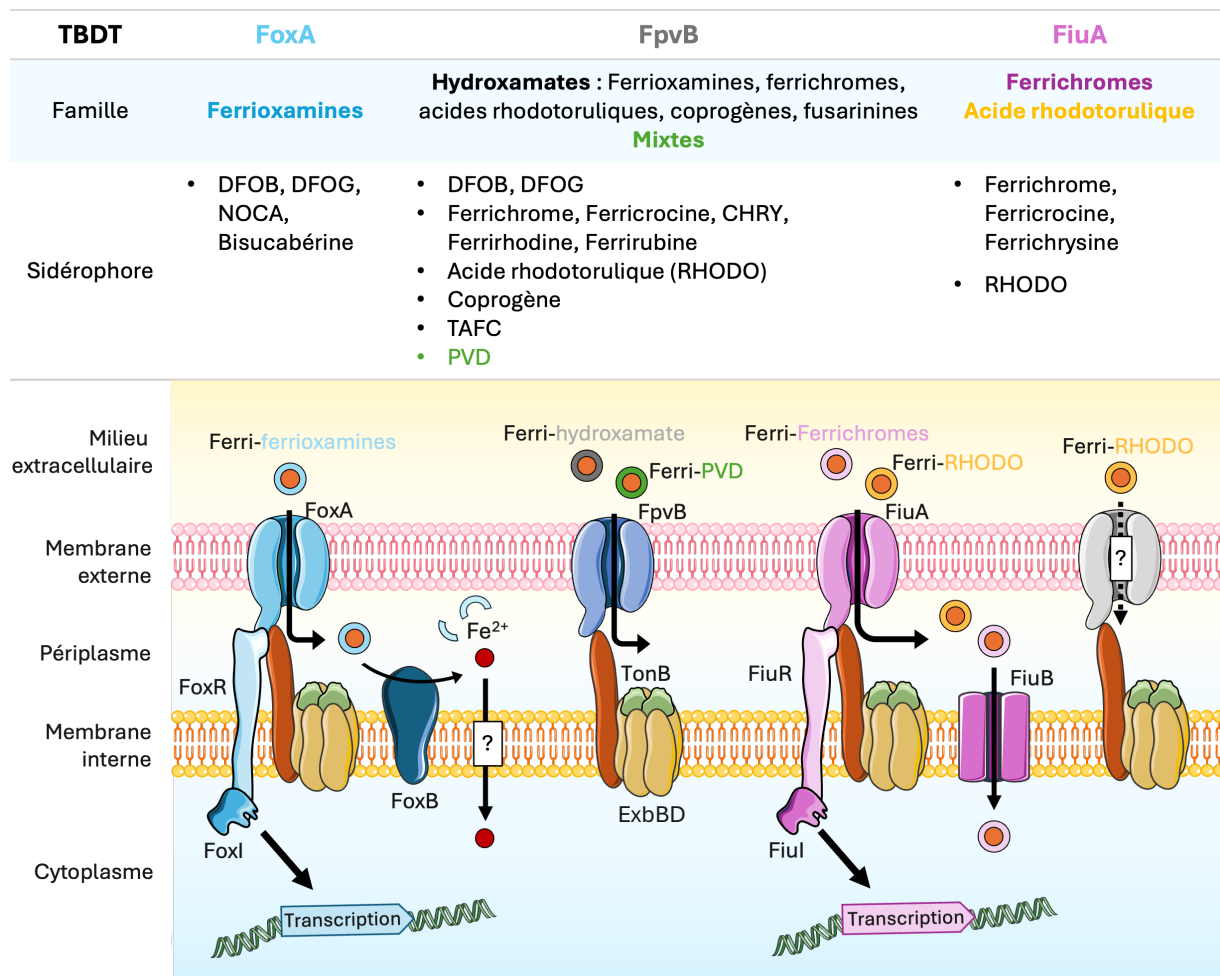


Figure 65 : Voie d'acquisition du fer par les sidérophores de type hydroxamate chez *P. aeruginosa* telle qu'elle est connue à ce jour. Pour plus de détails, voir le texte.

Par ailleurs, les expériences d'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$  ont révélé une efficacité d'import variable selon le xénosidérophore utilisé. Les composés les moins efficaces (TAFC, fusigène, ferrirubine, coprogène) traversent la membrane externe uniquement par le TBDT FpvB avec des niveaux d'import compris entre  $50$  et  $100 \text{ pmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{DO}_{600}^{-1}$ . En revanche, les plus efficaces (ferricrocine, ferrichrysine) utilisent à la fois FpvB et FiuA, atteignant respectivement  $360$  et  $250 \text{ pmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{DO}_{600}^{-1}$ . Ces différences d'efficacité d'import du fer n'altèrent pas la croissance bactérienne. Il reste à déterminer si ces différences d'efficacité sont liées aux propriétés intrinsèques des TBDTs ou à leur niveau d'expression. En effet, la régulation des gènes codant ces TBDTs diffère : tandis que *fpvB* est uniquement régulé par le répresseur Fur, *fiuA* et *foxA* sont également soumis à un contrôle par des systèmes ECF sigma/anti-sigma. Nos données transcriptomiques et

protéomiques différentielles montrent une induction de *fiuA* en présence de ferricrocine, ferrichrysrine et RHODO, et de *foxA* en présence de DFOG, suggérant une expression potentiellement plus élevée de ces transporteurs par rapport à FpvB. Une tendance similaire est observée avec FoxE 3-5, pour lequel l'induction de *foxA* est plus marquée que celle observée avec FoxE 2-6, aboutissant à un transport de  $^{55}\text{Fe}$  plus efficace dans les bactéries au cours du temps (respectivement 183 et 125  $\text{pmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{DO600}^{-1}$ ). Cette hypothèse devra toutefois être confirmée par des études complémentaires.

Dans le cas des sidérophores mixtes alpha-hydroxycarboxylate/hydroxamate et des sidérophores de type alpha-hydroxycarboxylate, les études de croissance bactérienne et d'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$  ont révélé des spécificités de reconnaissance distinctes pour les TBDTs ActA (PA3268) et ChtA. ActA importe spécifiquement des complexes ferriques avec des sidérophores de type alpha-hydroxycarboxylate, tels que la RHIZOF et la STAPH A, tandis que ChtA est impliqué dans l'import du fer par des sidérophores mixtes alpha-hydroxycarboxylate/hydroxamates tels que l'AERO, l'ARTHRO, la SCHIZO et la rhizobactine (Figure 66) (Cuív *et al.*, 2006). Nos résultats indiquent également que ChtA est l'unique transporteur de l'AERO, tandis que la SCHIZO et l'ARTHRO sont également transportés par un second TBDT non encore identifié (Figure 66). Tous ces sidérophores, à l'exception de l'ARTHRO, permettent un import efficace du fer chez *P. aeruginosa* avec des niveaux compris entre 280 et 400  $\text{pmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{DO600}^{-1}$ .

Dans le cas des sidérophores de type hydroxycarboxylate, une inhibition partielle de l'import de  $^{55}\text{Fe}$  est également observée dans une souche délétée pour *actA* (respectivement 69 % et 39 % d'inhibition), ce qui suggère l'existence d'un second TBDT capable de les transporter. Toutefois, le fer semble indisponible pour la bactérie, probablement en raison d'une incapacité des ferri-xénosidérophores à interagir avec les enzymes responsables de la libération intracellulaire du fer. Pour les sidérophores mixtes, les expériences d'import de  $^{55}\text{Fe}$  révèlent que le second TBDT impliqué dans le transport des complexes ferri-ARTHRO et ferri-SCHIZO est moins performant que ChtA à importer le fer, bien qu'il permette d'assurer la survie bactérienne en condition de carence en fer. Cette plus faible efficacité peut résulter d'une plus faible expression de ce TBDT alternatif ou d'une

affinité réduite des complexes ferriques pour son site de liaison. De plus, l'expression de ce TBDT ne semble pas induite par la présence de l'ARTHRO et la SCHIZO dans l'environnement de la bactérie. De manière surprenante, la présence des sidérophores de type hydroxycarboxylate n'induit pas l'expression *d'actA*, bien que ce gène semble être régulé par un facteur transcriptionnel de la famille AraC, codé par le gène *PA3269* et situé en aval *d'actA* (Figure 66). Ce mode de régulation rappelle celui retrouvé pour *fptA*, qui code pour le TBDT impliqué dans l'import du complexe ferri-PCH et dont l'expression est activée par la liaison cytoplasmique du complexe ferrique au régulateur AraC PchR dans le cytoplasme (Michel *et al.*, 2005, 2007; Cunrath *et al.*, 2020). Nos données transcriptomiques et protéomiques suggèrent ainsi que la RHIZOF et la STAPH A ne parviennent pas à induire efficacement la transcription et l'expression *d'actA*. En ce qui concerne *chtA*, d'après le génome de *P. aeruginosa* et nos résultats, son expression semble exclusivement régulée par Fur.

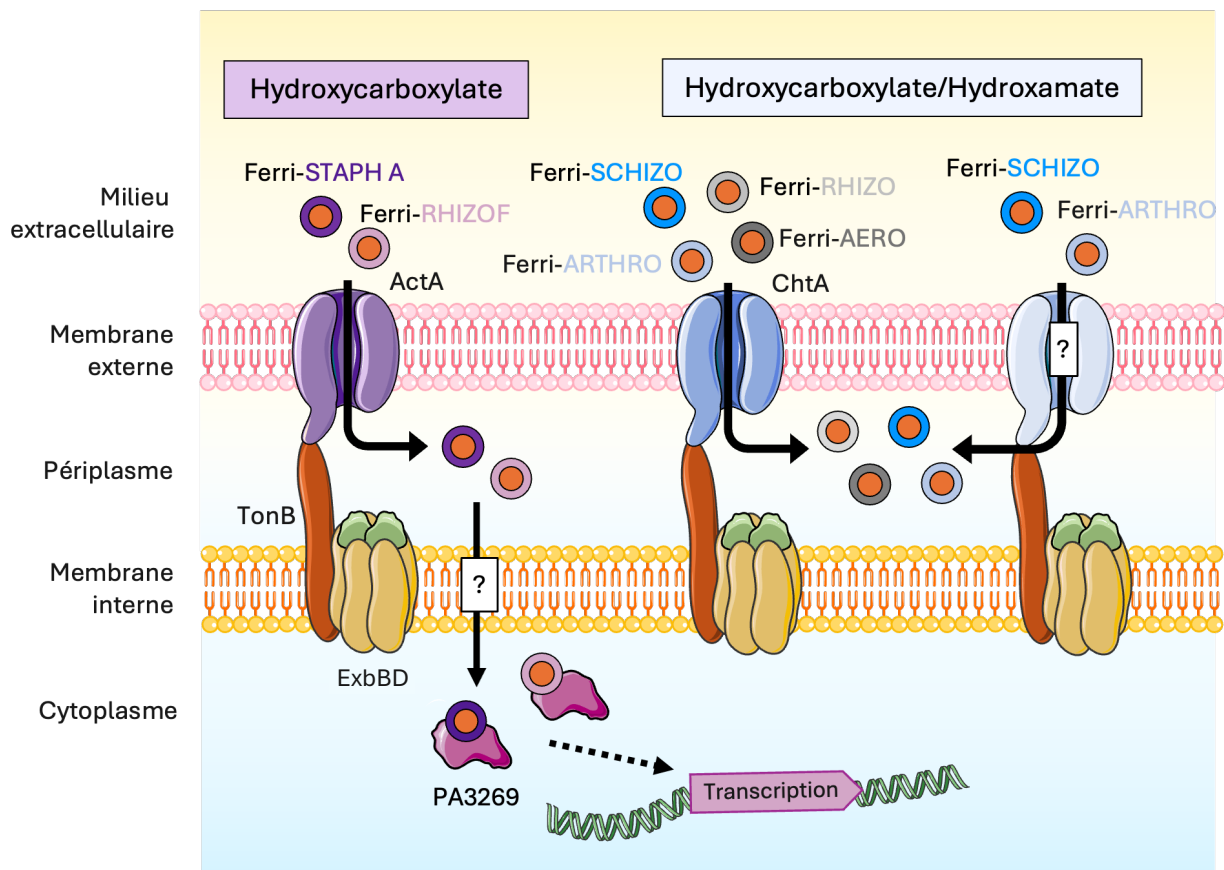


Figure 66 : Voie d'acquisition des sidérophores de type hydroxycarboxylate (RHIZOF, STAPH A) et des sidérophores mixtes hydroxycarboxylate/hydroxamate (AERO, ARTHRO, RHIZO, SCHIZO) chez *P. aeruginosa*. Les protéines jouant un rôle hypothétique dans la voie sont encadrées en blanc.

Concernant le sidérophore PCH, des analyses par spectrométrie de masse ont révélé qu'il subit une hydrolyse suivie d'une oxydation en solution, conduisant à la formation de DHA et AA, *via* un

mécanisme non élucidé (Figure 67). Des approches de protéomique différentielle ainsi que l'utilisation de rapporteurs fluorescents, ont permis de démontrer que l'AA et le DHA, tout comme la PCH, induisent l'expression de *femA*, initialement identifié comme le TBBDT de la ferri-mycobactine chez *P. aeruginosa*. La mycobactine partage en effet des caractéristiques structurales et chimiques avec la PCH, l'AA et le DHA (Llamas *et al.*, 2008). Des expériences de croissance et d'import de <sup>55</sup>Fe sur une souche incapable de produire ses propres sidérophores ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ) et délétée pour *femA* ont confirmé que FemA est impliqué dans l'import du fer par l'AA et le DHA et que l'induction de l'expression de *femA* observée en présence de PCH résulterait en réalité de sa dégradation en DHA et AA en solution (Figure 67). L'ensemble de ces résultats indique qu'en condition de carence modérée en fer, lorsque seule la PCH est produite, ses produits de dégradation, l'AA et le DHA, permettent à la bactérie d'accéder au fer en induisant l'expression de *femA*.

Il est établi que la PVD joue un rôle majeur lors des premières étapes de l'infection par *P. aeruginosa*, et que la persistance de ce pathogène au cours de l'infection s'accompagne généralement d'une inhibition de sa virulence et d'une absence de production de PVD (Luzar and Montie, 1985; Konings *et al.*, 2013). Dans ce contexte, on peut envisager que *P. aeruginosa* exploite alors la dégradation de la PCH comme stratégie alternative pour l'acquisition du fer. Par ailleurs, ce mécanisme semble également actif chez les souches produisant à la fois la PVD et la PCH, lorsqu'elles se trouvent en carence modérée en fer (environ 300 nM Fe), condition dans laquelle notre équipe a montré que la bactérie produit essentiellement de la PCH et très peu de PVD (Cunrath *et al.*, 2016). Ainsi, dans ces conditions, *P. aeruginosa* optimise non seulement la biosynthèse de la PCH, mais tire également parti de ses produits de dégradation comme sidérophores. Un phénomène similaire a été décrit chez *E. coli*, dont le produit de dégradation de l'entérobactine, le 2,3-dihydroxybenzoylsérine (DHBS) reste capable de chélater le fer et peut être utilisé comme sidérophore, aussi bien par *E. coli* que par *P. aeruginosa* (Moynié *et al.*, 2019). Par ailleurs, *Luteibacter anthropi*, une bactérie opportuniste, est capable de produire un dérivé de la PCH, l'antrochéline (Büttner *et al.*, 2023). Il serait intéressant de vérifier si FemA est également capable d'importer le fer par ce xénosidérophore chez *P. aeruginosa*.

La résolution de la structure cristallographique de FemA en complexe avec les formes ferriques de l'AA, du DHA et de la PCH révèle une interaction similaire de ces composés au site de liaison de



FemA. Toutefois, aucun import du complexe PCH-Fe n'a été détecté, malgré l'induction de l'expression de *femA* observée en sa présence. Ces résultats peuvent s'expliquer soit par une interaction réduite de la PCH avec l'un des résidus du site de liaison, comparé aux ligands AA-Fe et DHA-Fe, soit par une polarité globale différente entre les complexes PCH-Fe et AA-Fe ou DHA-Fe au sein du site de liaison. Ces petites différences d'interaction de PCH-Fe avec le site de liaison de FemA comparé à AA-Fe et DHA-Fe, pourraient empêcher le complexe PCH-Fe de déclencher les changements conformationnels nécessaires à son transport à travers la membrane externe. Néanmoins, la liaison du complexe PCH-Fe à FemA suffit à activer la transcription de *femA* via le système sigma/anti-sigma FemR/FemI. Dans ce type de régulation, la liaison du complexe ferri-sidérophore au TBDT induit une interaction de la TonB box avec TonB, ce qui modifie l'orientation du domaine de signalisation du TBDT. Cette réorientation permet alors son interaction avec le facteur anti-sigma ancré dans la membrane interne, entraînant la libération du facteur sigma qui initie la réponse transcriptionnelle (Brillet *et al.*, 2007; Josts *et al.*, 2019).

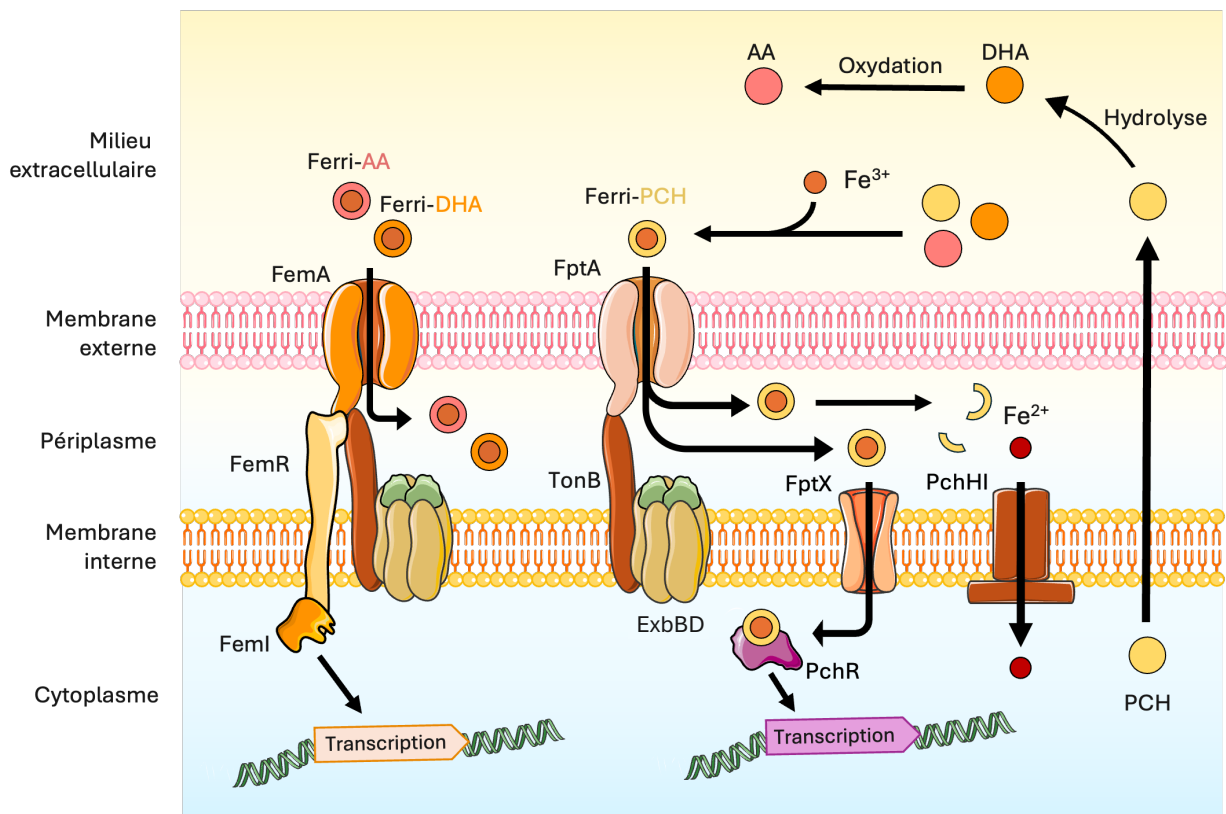


Figure 67 : Voie d'acquisition du fer de la PCH et de ses produits de dégradation (AA, DHA) chez *P. aeruginosa*. Pour plus de détails, voir le texte.

Les données obtenues durant ce travail de thèse ont considérablement enrichi la liste des xénosidérophanes utilisables par *P. aeruginosa*, aujourd'hui portée à 43 composés (Tableau 8). Elles ont également permis de mieux comprendre les sélectivités de liaison et de transport des TBDTs FpvB, FiuA, FoxA, FemA, ChtA et ActA. Ces résultats montrent que la tolérance aux modifications structurales de sidérophanes varie selon le TBDT impliqué. Toutefois, la forme, la taille, la structure chimique et la géométrie de la sphère de coordination autour du fer ainsi que la charge électrochimique du sidérophore sont des paramètres cruciaux pour sa reconnaissance par le transporteur. Ces éléments corroborent des observations antérieures, notamment dans le cas de la liaison de l'ENT-Fe au TBDT PfeA, pour laquelle l'interaction, bien que non stéréospécifique, nécessite obligatoirement la présence des groupements catéchols pour assurer la reconnaissance du complexe ferrique avec PfeA (Thulasiraman *et al.*, 1998).

Parmi les TBDTs, FpvB se distingue par une spécificité de reconnaissance particulièrement large. La résolution de sa structure cristallographique permettrait de mieux comprendre pourquoi FpvB, contrairement aux autres TBDTs, peut reconnaître un aussi grand nombre de sidérophanes. Par ailleurs, sa conservation dans plus de 93 % des souches cliniques et des isolats environnementaux (Chan and Burrows, 2022), souligne son importance dans l'acquisition du fer *via* les xénosidérophanes. FpvB représente une voie d'import peu coûteuse pour la bactérie en condition de carence en fer, tout en lui offrant l'accès à un large panel de sidérophanes. Enfin, sa faible spécificité de reconnaissance en fait une cible de choix pour des approches thérapeutiques basées sur la stratégie de cheval de Troie, consistant à vectoriser des antibiotiques avec des sidérophanes et permettre ainsi leur import dans les bactéries (Mislin and Schalk, 2014; Peukert *et al.*, 2022).

**Tableau 8 :** Liste actualisée des TBDTs présents dans le génome de *P. aeruginosa* PAO1. Les contributions réalisées au cours de cette thèse sont représentées en rouge. La transcription de certains TBDTs est régulée en bleu, par des facteurs sigma / antisigma ; en jaune, par des systèmes à deux composants ; en vert, par des régulateurs AraC ou en orange, par des régulateurs de type IclR. La première colonne indique également le rôle de certains TBDTs dans l'homéostasie des métaux (le fer en orange ; le zinc en gris ; le cuivre en bleu et le cobalt en vert).

Gène	Nom	Ligand (L)	Référence	Statut
PA0151	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA0192	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA0434	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA0470	FiuA	Ferrichrome, <b>Ferricrocine</b> , <b>Ferrichry sine, RHODO</b>	(Llamas <i>et al.</i> , 2006; Hannauer <i>et al.</i> , 2010; <b>Will <i>et al.</i>, 2024</b> )	
PA0781	ZnuD	Zn <sup>2+</sup>	(Pederick <i>et al.</i> , 2015)	
PA0931	PirA	Entérobactine, Monocatéchols	(Ghysels <i>et al.</i> , 2005; Moynié <i>et al.</i> , 2017)	
PA1271	BtuB	Cobalamine	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA1302	HxuA	Hème	(Luzar and Montie, 1985; Cornelis and Bodilis, 2009; Konings <i>et al.</i> , 2013)	
PA1322	PfuA		(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA1365	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA1613	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA1910	FemA	Mycobactine, Carboxymycobactine, <b>dérivés de la pyochéline (AA, DHA)</b>	(Llamas <i>et al.</i> , 2008; <b>Will <i>et al.</i>, 2025</b> )	
PA1922	CirA	Zn	(Pederick <i>et al.</i> , 2015)	
PA2057	SppR		(Pletzer <i>et al.</i> , 2016)	
PA2070	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2089	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2289	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2335	OptO		(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2398	FpvA	Pyoverdine	(Poole <i>et al.</i> , 1991)	
PA2466	FoxA	DFOB, <b>DFOG</b> , Nocardamine, <b>FoxE 2-5, FoxE 2-6, FoxE 3-5</b> , Bisucabérine	(Llamas <i>et al.</i> , 2006; Normant <i>et al.</i> , 2020; Chan <i>et al.</i> , 2023; <b>Will <i>et al.</i>, 2024</b> )	
PA2590	-	-	(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit
PA2688	PfeA	Entérobactine	(Poole <i>et al.</i> , 1990)	
PA2911		Zn	(Pederick <i>et al.</i> , 2015)	
<b>PA3268</b>	<b>ActA</b>	<b>Rhizoferrine, Staphyloferrine A</b>	<b>(Will <i>et al.</i>, 2023)</b>	
PA3408	HasR	HasAP-hème	(Smith and Wilks, 2015)	
PA3790	OprC	Cuivre	(Bhamidimarri <i>et al.</i> , 2021)	
PA3901	FecA	Citrate	(Marshall <i>et al.</i> , 2008)	
PA4156	FvbA	Vibriobactine	(Elias <i>et al.</i> , 2011)	
PA4168	FpvB	Pyoverdine, DFOB, <b>DFOG</b> , <b>FoxE 2-6, FoxE 3-5</b> , Ferrichrome, <b>Ferricrocine</b> , <b>Ferrichry sine, RHODO, TAFC</b> , <b>Fusigène, Coprogène</b> , <b>Ferrirhodine, Ferrirubine</b>	(Ghysels <i>et al.</i> , 2004; Chan and Burrows, 2022; <b>Will <i>et al.</i>, 2024</b> )	
PA4221	FptA	Pyochéline, Cépabactine	(Ankenbauer and Quan, 1994)	
PA4514	PiuA	Monocatéchols	(Moynié <i>et al.</i> , 2017)	
PA4675	ChtA	Aérobactine, <b>Arthrobactine</b> Rhizobactine, Schizokinen	(Cuív <i>et al.</i> , 2006; <b>Will <i>et al.</i>, 2023</b> )	
PA4710	PhuR	Hème	(Smith and Wilks, 2015)	
PA4837	CntO	Pseudopaline (Zn)	(Lhospice <i>et al.</i> , 2017)	
PA4897	OptI		(Cornelis and Bodilis, 2009)	Prédit

## 2 Utilisation des sidérophores par *P. aeruginosa* en biofilm

Au cours de mon travail de thèse, je me suis également intéressée à l'utilisation des xénosidérophores par *P. aeruginosa* en biofilm pour accéder au fer. Les images de microscopie obtenues révèlent une structure de biofilm homogène, plate et peu épaisse (environ 7  $\mu\text{M}$  d'épaisseur après 6 jours de culture) où chaque temps que nous avons choisi pour nos analyses de microscopie confocale semble correspondre à une étape du développement du biofilm : l'adhésion initiale à la surface (J2), la maturation I (J4), puis la maturation II (J6) (Figure 68). La formation d'une telle structure s'explique par la disponibilité limitée en fer et la nature de la source de carbone présente dans l'environnement, deux paramètres connus pour influencer l'architecture, l'épaisseur et la composition du biofilm (Shrout *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2022). La formation d'un biofilm plat reflète en effet une mobilité de surface prolongée (Shrout *et al.*, 2006), cohérente avec un développement plus lent du biofilm observé. Une phase de croissance de près de 4 jours est en effet nécessaire avant la production matricielle, contrairement aux conditions riches où cette formation intervient dès 48 h de culture (Shrout *et al.*, 2006). Cette différence peut s'expliquer par les conditions de forte carence en fer dans lesquelles les expériences ont été réalisées, avec seulement 20 nM de fer disponible, une concentration insuffisante pour soutenir efficacement la formation du biofilm (Banin *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007). Par ailleurs, les acides casaminés constituent une source de carbone plus coûteuse en énergie pour *P. aeruginosa* que le glucose, ce qui contribue également à ralentir la croissance et la maturation du biofilm dans nos conditions expérimentales (Shrout *et al.*, 2006).

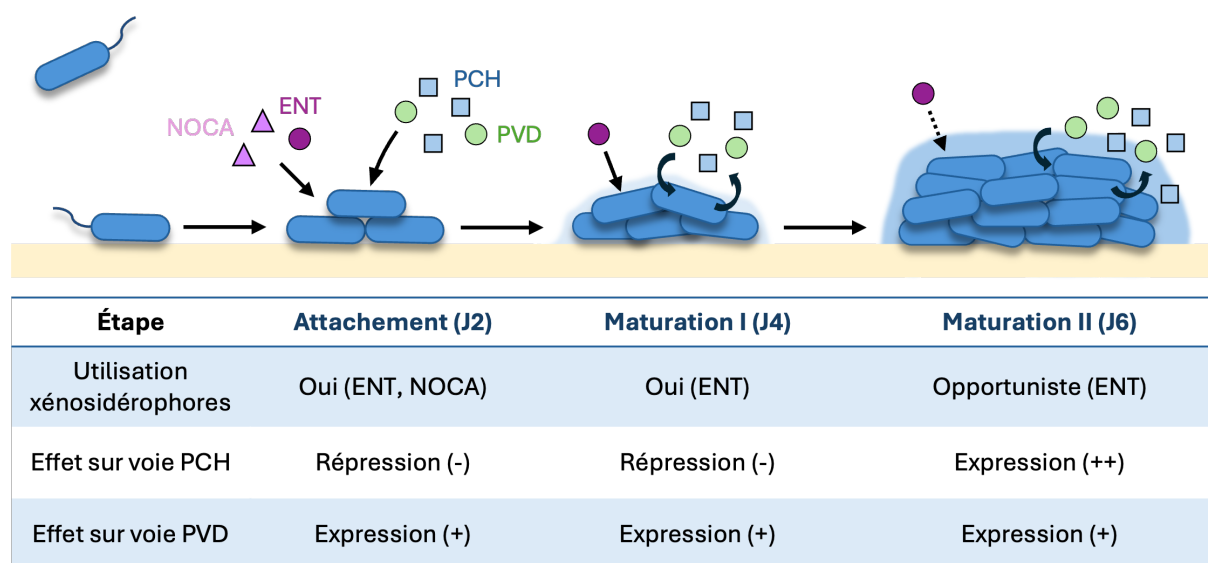
L'analyse qualitative des données obtenues par microscopie confocale des biofilms cultivés en absence de xénosidérophores ont montré une induction homogène et stable de l'expression des gènes *fptA* et *fpvA* pour toutes les cellules du biofilm (absence de l'expression de *pfeA* ou *foxA*), indiquant que la bactérie utilise ces deux voies pour accéder au fer. Contrairement aux biofilms matures en forme de « champignon », où des gradients d'expression ont été rapportés (Worlitzsch *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 2013) en lien avec des variations locales d'oxygène et de nutriments, nos biofilms cultivés en milieu CAA présentent une apparente homogénéité d'expression, possiblement liée à leur faible épaisseur (environ 7  $\mu\text{M}$ ). Une quantification reste toutefois nécessaire pour confirmer cette homogénéité selon la profondeur.

Par ailleurs, une étude récente a montré qu'une augmentation de la densité cellulaire s'accompagne généralement d'une homogénéisation de l'expression des voies d'import des sidérophores endogènes au sein de la population, où les variations intercellulaires observées reflèteraient plutôt l'état métabolique des cellules qu'une expression hétérogène des voies endogènes (Mridha *et al.*, 2024). L'analyse quantitative en cours associée à un test de viabilité cellulaire au sein du biofilm permettra d'évaluer leur état métabolique et de voir si nous avons, nous aussi, un gradient d'expression de *fptA* et/ou *fpvA* au sein des bactéries du biofilm qu'elles soient localisées plus ou moins en profondeur ou en surface du biofilm.

La quantification de la production de PVD et PCH au sein du biofilm a révélé que l'induction de la transcription de *fptA* et *fpvA* s'accompagnait d'une production des sidérophores correspondants, cohérent avec la régulation connue de ces voies (Lamont *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2005). Cette observation est en accord avec les données de la littérature rapportant l'implication des sidérophores endogènes dans l'acquisition du fer dans le développement du biofilm chez *P. aeruginosa* (Banin *et al.*, 2005; Díaz-Pérez *et al.*, 2022). La production stable de PVD au cours du temps suggère également un rôle majeur de ce sidérophore dans la formation du biofilm chez *P. aeruginosa* ainsi qu'une probable régulation de cette production par la bactérie.

Par ailleurs, la concentration plus importante de PCH dans le surnageant comparée à celle de la PVD corrèle avec l'induction plus marquée de l'expression de *fptA* comparée à *fpvA*. Ce phénomène, déjà observé en conditions planctoniques chez *P. aeruginosa* cultivé en milieu CAA (Cunrath *et al.*, 2016; Ferry *et al.*, 2024), suggère que les stratégies d'acquisition du fer mises en œuvre par la bactérie sont conservées quel que soit son mode de vie, mais dépendent de la disponibilité en fer dans le milieu. Il serait ainsi pertinent d'explorer plus en détail l'implication de la voie PCH dans la formation du biofilm qui semble, à première vue, jouer un rôle majeur notamment dans les étapes de maturation du biofilm. Cette hypothèse pourra être confirmée par l'usage de souches incapables de produire la PVD, ou la PCH ou les deux. De plus, l'accumulation de PCH dans le milieu au cours du temps conduit probablement à sa dégradation spontanée en AA et DHA. Leur présence devra être confirmée par spectrométrie de masse et leur utilisation par les cellules du biofilm pourra être observée avec un rapporteur fluorescent du TBDT FemA (PAO1 (*P<sub>femA</sub>-ypet*)) que nous avons déjà au laboratoire.

L'analyse qualitative par microscopie confocale des biofilms a également permis d'observer une induction plus importante de la transcription de *pfeA* que *foxA* en réponse à la présence respectivement des xénosidérophores ENT et NOCA dès le début de la formation des biofilms. Cette induction est associée à une diminution de la transcription de *fptA* mais ce profil d'expression s'inverse au cours du temps. Ces résultats suggèrent que l'utilisation des xénosidérophores par *P. aeruginosa* pour accéder au fer semble dépendante de l'affinité du xénosidérophore pour le fer mais aussi de la présence matricielle. Ainsi, leur utilisation semble privilégiée dans les premières étapes de formation du biofilm où peu de matrice est présente et où les xénosidérophores semblent plus accessibles pour les cellules. À mesure que le biofilm se développe et que la matrice s'épaissit, la bactérie semble favoriser l'usage de ses sidérophores endogènes, en particulier la PCH, probablement en raison de leur meilleure accessibilité. La production de matrice limiterait donc l'accès au fer *via* les xénosidérophores. Ces observations ont permis d'établir un premier modèle de formation du biofilm de *P. aeruginosa* en condition de carence en fer (milieu CAA) et de caractériser l'exploitation des xénosidérophores pour accéder au fer au cours de ce processus (Figure 68).



**Figure 68 :** Modèle proposé de formation du biofilm de *P. aeruginosa* dans nos conditions expérimentales en réponse à la présence de xénosidérophores. L'exploitation des xénosidérophores semble privilégiée aux premières étapes de formation du biofilm, tandis que les voies endogènes, surtout celle de la PCH, prennent le relais au cours de la maturation II.

Ces expériences devront toutefois être étendues à d'autres sidérophores de type catéchol et hydroxamate, afin de confirmer les résultats obtenus. Des expériences réalisées sur les sidérophores de la famille des hydroxycarboxylate permettront également de déterminer si cette modulation est

ou non spécifique de la nature chimique du xénosidérophore utilisé et de son affinité pour le fer. Enfin, l'analyse quantitative en cours permettra de confirmer les observations qualitatives présentées dans ce manuscrit. En effet, cette approche, basée sur des outils de détection cellulaire automatisée par apprentissage machine (machine learning), permettra de quantifier la fluorescence mCherry et Ypet pour chaque cellule du biofilm et ce, sur l'ensemble des plans (X, Y et Z), ce que ne permet actuellement pas l'approche qualitative où l'axe Z est pour le moment difficilement pris en compte dans cette analyse qualitative. Cette approche visera à évaluer l'homogénéité d'expression de Ypet entre les cellules et les réplicats biologiques réalisés, ainsi qu'à localiser et comparer l'intensité du signal fluorescent au sein du biofilm. Parallèlement, une analyse transcriptionnelle par qRT-PCR sera également réalisée à partir des cellules des biofilms formés dans les mêmes conditions expérimentales. Cette approche permettra également de vérifier au niveau transcriptionnel la fiabilité du système de rapporteurs fluorescents utilisés mais aussi les profils d'induction observés pour les différents TBDTs en fonction des conditions expérimentales.

### 3 Les xénosidérophores au sein des communautés microbiennes

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste impliqué dans des infections allant des formes aiguës aux formes chroniques, notamment chez les grands brûlés ou les personnes atteintes de mucoviscidose. Que ce soit en contexte infectieux ou environnemental, *P. aeruginosa* évolue dans des milieux pauvres en fer, ce qui limite sa croissance et entraîne une forte compétition entre les microorganismes pour ce nutriment. Dans ce cadre, la production et l'utilisation de sidérophores représente un atout majeur pour assurer sa persistance dans la niche écologique.

Chez l'Homme, *P. aeruginosa* est fréquemment retrouvée en co-infection avec des espèces fongiques telles que *Candida* et *Aspergillus*, exacerbant la compétition pour les nutriments, la production de facteurs de virulence, ou encore la modulation du système immunitaire, aggravant ainsi l'infection (Kelly *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2023). Dans ce contexte, la production et l'utilisation de sidérophores influencent fortement la dynamique de croissance et de virulence bactérienne (Schrettl *et al.*, 2007). En effet, la PVD produite par *P. aeruginosa* inhibe la croissance d'*A. fumigatus* en restreignant son accès au fer (Sass *et al.*, 2017). En réponse, *A. fumigatus* produit les sidérophores



FRC, ferrichrysine et TAFC, qui rentrent en compétition avec la PVD pour le fer, réduisant partiellement la carence induite (Sass *et al.*, 2019; Bastos *et al.*, 2022). Comme nous avons pu le montrer au cours de cette thèse, *P. aeruginosa* peut également tirer parti de cette production de xénosidérophores, renforçant ainsi sa compétitivité dans l'environnement infectieux. À l'inverse, certains pathogènes, tels que *Candida albicans*, peuvent atténuer la virulence de *P. aeruginosa* en inhibant la production de PVD et PCH, comme cela a été démontré dans un modèle murin de colonisation gastro-intestinale chez des souris neutropéniques (Lopez-Medina *et al.*, 2015).

Des co-infections bactériennes sont également fréquentes, notamment entre *P. aeruginosa* et *S. aureus*, chez les patients atteints de mucoviscidose, illustrant une compétition inter-bactérienne pour le fer. *P. aeruginosa*, en plus de la production de ses propres sidérophores, peut exploiter la production de STAPH A par *S. aureus* pour accéder au fer *via* le TBBDT ActA. En réponse, *S. aureus*, peut inactiver la PCH produite par *P. aeruginosa* par méthylation, empêchant son utilisation comme sidérophore par *P. aeruginosa* (Jenul *et al.*, 2023). Comprendre ces interactions microbiennes est donc crucial pour développer de nouvelles stratégies de prévention ou de traitement des infections polymicrobiennes, en particulier dans un contexte d'antibiorésistance croissante.

*P. aeruginosa* est également retrouvée dans des environnements naturels ou anthropisés, en cohabitation avec des espèces de Streptomyces et de mycètes, où la compétition pour le fer constitue une interaction centrale entre microorganismes. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont démontré la capacité de *P. aeruginosa* à utiliser un grand nombre de xénosidérophores de type hydroxamate produits par ces microorganismes dans une stratégie de coopération où l'accessibilité accrue au fer bénéficie aux deux partenaires. Ces observations font écho à celles rapportées par Jurkevitch *et al.* entre *P. aeruginosa* et *P. putida* (Jurkevitch, Y. Hadar, *et al.*, 1992, 1992). La présence de sidérophores de type alpha-hydroxycarboxylate (RHIZOF et AERO), notamment dans les couches superficielles du sol (Rai *et al.*, 2020), contribue également à la persistance de *P. aeruginosa* dans cette niche écologique selon une logique similaire de coopération. La nature des interactions intermicrobiennes est toutefois modulée par de nombreux facteurs, tels que la disponibilité des nutriments et la composition des communautés microbiennes. Comprendre ces interactions est essentiel, notamment en vue d'applications potentielles en agriculture ou encore en bioremédiation.

Ainsi, *P. aeruginosa* a évolué pour tirer parti d'un large éventail de xénosidérophores afin d'optimiser son acquisition de fer. Cette compétition pour le fer met en lumière la complexité des réseaux microbiens et leur remarquable capacité d'adaptation, illustrant comment des stratégies coopératives ou compétitives permettent à certains organismes de dominer dans des environnements contraints, un domaine dans lequel *P. aeruginosa* excelle indéniablement.

## 4 Conclusion

Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'utilisation de xénosidérophores par *P. aeruginosa* pour l'acquisition du fer. J'ai identifié 19 nouveaux xénosidérophores utilisés par la bactérie, parmi lesquels neuf hydroxamates (RHODO, TAFC, coprogène, fusigène, ferricrocine, ferrichrysine, ferrirhodine, ferrirubine et DFOG), cinq hydroxycarboxylates (AERO, ARTHRO, SCHIZO, RHIZOF et STAPH A), ainsi que trois analogues synthétiques de la NOCA (FoxE 2-5, FoxE 2-6 et FoxE 3-5). Nous avons montré que les TBDTs FpvB, FiuA et FoxA sont impliqués dans l'import du fer *via* les xénosidérophores de type hydroxamate, tandis qu'ActA et ChtA le sont dans le cas des hydroxycarboxylates. L'étude a également révélé que la PCH subit une dégradation spontanée en AA et DHA, qui sont eux-mêmes utilisés comme sidérophores par *P. aeruginosa*, *via* le transporteur FemA. La structure cristallographique de FemA a montré une interaction similaire avec les complexes AA-Fe, DHA-Fe et PCH-Fe.

Enfin, l'analyse de la formation du biofilm a montré qu'en absence de xénosidérophores, les TBDTs FptA et FpvA, responsables de l'import des sidérophores endogènes PCH et PVD, sont exprimés de manière stable tout au long du développement, avec une expression apparemment plus élevée de *fptA* que de *fpvA*, et une production plus importante de PCH que de PVD. L'ajout d'ENT ou de NOCA dès le début de la culture induit l'expression de *pfeA* ou *foxA* aux premiers stades du biofilm, suggérant une utilisation préférentielle de ces composés pour accéder au fer avant l'activation de l'expression des voies endogènes, notamment celle de la PCH. L'efficacité des xénosidérophores à être utilisés par les bactéries pour accéder au fer dépendrait de leur affinité pour le fer, de leur capacité à diffuser dans la matrice, et du moment de leur ajout. La matrice du biofilm semble également constituer une barrière à leur diffusion, en particulier pour la NOCA, sauf lorsqu'ils sont présents dès les premières étapes de formation du biofilm.

Pris dans leur ensemble, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mieux comprendre les stratégies mises en œuvre par *P. aeruginosa* pour exploiter un large éventail de xénosidérophores, illustrant l'optimisation exceptionnelle de ses systèmes d'acquisition du fer en réponse à son environnement. Ces résultats soulignent la complexité des interactions au sein des communautés microbiennes, tout en mettant en évidence la remarquable capacité d'adaptation de *P. aeruginosa*, à l'origine de sa survie et de son maintien dans de nombreux environnements.

# PARTIE IV : MATÉRIEL & MÉTHODES



# 1 Produits, souches et conditions de culture

## 1.1 Réactifs chimiques

Les sidérophores acide rhodotorulique (RHODO), aérobactine (AERO), arthrobactine (ARTHRO), coprogène, desferrioxamine G (DFOG), ferricrocine, ferrichrysine, ferrirhodine, ferrirubine, fusigène, rhizoferrine (RHIZOF), schizokinen (SCHIZO) et triacétylfusarinine C (TAFC) ont été fournis par Biophore Research products (Tübingen, Allemagne). Les sidérophores pyochéline (PCH), néopyochéline et staphyloferrine A ont été synthétisés selon les protocoles décrits précédemment (Zamri and Abdallah, 2000; Cooper *et al.*, 2014). La synthèse des sidérophores acide aéruinoïque (AA) et acide dihydroaéruinoïque (DHA) a été décrite dans le matériel supplémentaire de l'article n°3. L'ensemble des sidérophores utilisés sont solubilisés dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO).

Le  $^{55}\text{FeCl}_3$  a été fourni par Perkin Elmer Life and Analytical Science (Waltham, MA, USA) et le protonophore carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone (CCCP) par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

## 1.2 Construction des mutants de *P. aeruginosa*

### 1.2.1 Construction du vecteur suicide intégrant la modification génique

Deux fragments d'environ 700 pb, situés en amont et en aval du gène cible, sont amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique de *P. aeruginosa* en utilisant la polymérase Phusion® High-Fidelity. Les amorces sont conçues pour intégrer des sites de restriction et recouvrir les extrémités 5' du fragment en amont et 3' du fragment en aval. Le produit PCR est purifié à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel). Les deux fragments de 700 pb, utilisés en quantités équivalentes, sont ensuite assemblés par PCR pour générer un fragment de 1400 pb. Ce fragment est purifié, digéré avec des enzymes de restriction appropriées, puis inséré dans le plasmide pEXG2 préalablement digéré avec les mêmes enzymes, à l'aide de la T4 DNA ligase (Thermo). Le produit de ligation est introduit par choc thermique dans des bactéries compétentes *E. coli* TOP10, qui sont ensuite étalées sur une gélose LB contenant 15 µg/mL de gentamicine. Les clones obtenus sont analysés par PCR à l'aide de la polymérase Dream Taq (Thermo), et les plasmides sélectionnés sont envoyés pour séquençage.

### 1.2.2 Conjugaison triparentale et sélection de clones recombinants

*P. aeruginosa* est cultivée en milieu LB à 43°C avec agitation (220 rpm) sur la nuit pour augmenter la perméabilité membranaire en vue de la conjugaison, tout en réduisant son système de restriction. Parallèlement, les souches d'*E. coli* (la souche « helpouse » et celle portant le vecteur suicide) sont cultivées à 37°C dans les mêmes conditions. Les trois souches sont mélangées à quantité égale, puis centrifugées pendant 2 min à 8500 rpm. Les culots bactériens sont repris dans 30 µL de milieu LB et déposés en goutte sur une gélose LB. Après 5 h d'incubation à 37°C, le spot bactérien est resuspendu dans 1 mL de milieu LB, et 100 µL de la dilution sont étalés sur une gélose LB contenant 30 µg/mL de gentamicine (pour sélectionner les bactéries ayant intégré le vecteur suicide) et 10 µg/mL de chloramphénicol (pour éliminer les souches *E. coli*). Cette étape permet de sélectionner les souches ayant intégré le plasmide par recombinaison homologe dans leur génome, le vecteur suicide n'étant pas autorépliquatif dans *P. aeruginosa*. Après 48 h de culture à 37°C, les clones résistants sont transférés dans 1 mL de milieu LB et incubés pendant 4 h à 37°C. La culture est ensuite étalée sur boîte LB sans NaCl contenant 5% de saccharose (v/v). Une contre-sélection est réalisée en parallèle sur une gélose LB contenant 15 µg/mL de gentamicine pour sélectionner les clones sensibles, c'est-à-dire ceux ayant perdu le plasmide. Enfin, la modification génétique (insertion ou délétion du gène d'intérêt) est vérifiée par PCR sur colonie, et les mutants sélectionnés sont envoyés pour séquençage.

### 1.3 Milieux et conditions de culture

Pour toutes les expériences réalisées en conditions de carence en fer, les bactéries sont d'abord cultivées pendant 24 h sous agitation (220 rpm) dans 5 mL de milieu riche appelé milieu Luria-Bertani ou Lysogeny Broth (LB). Ce milieu riche en fer (5 µM) contient 20 g/L de LB broth Lennox et permet une croissance optimale de *P. aeruginosa* (Cunrath *et al.*, 2016). Les bactéries sont ensuite lavées et remises en suspension dans 10 mL de milieu CAA afin d'induire un état de carence en fer chez *P. aeruginosa*. Le milieu CAA est composé de 5 g/L d'acides casaminés (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA), 1,46 g/L de  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  et de 0,25 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  où le fer est présent en très faible concentration (20 nM) (Cunrath *et al.*, 2016). Les cultures bactériennes peuvent ensuite être utilisées pour les différentes expériences après une incubation sur la nuit en milieu CAA à 30°C et sous agitation (220 rpm).



## 2 Suivi de croissance bactérienne en culture planctonique

Les mutants de *P. aeruginosa* sont d'abord cultivés selon le protocole décrit ci-dessus. Après une incubation sur la nuit en milieu CAA à 30°C, les culots bactériens sont repris dans 10 mL de milieu CAA à une DO à 600 nm de 0,01 et distribués dans une plaque 96 puits à fond rond (Greiner, U-bottom microplate), en présence ou en absence de 10 µM ou d'une concentration croissante du sidérophore d'intérêt. Les plaques sont incubées à 30°C sous agitation dans un lecteur de microplaque (Infinite M200, TECAN). La croissance bactérienne (DO à 600 nm) est suivie toutes les 30 min pendant 24 h. Pour les expériences réalisées avec les rapporteurs fluorescents, la fluorescence de Ypet (excitation à 500 nm et émission à 540 nm) est suivie également toutes les 30 min pendant 24 h. Les données de chaque mesure représentent la moyenne et l'écart-type de trois réplicats biologiques, chaque réplicat biologique étant mesuré avec trois réplicats techniques.

## 3 Transport de <sup>55</sup>Fe chez *P. aeruginosa*

Les souches de *P. aeruginosa* sont cultivées en suivant le protocole décrit ci-dessus. Après 24 h de culture en milieu CAA, les cultures bactériennes sont lavées, diluées à une DO à 600 nm de 0,1 dans un volume de 10 mL de milieu CAA. Dans le cas où l'expression du système d'acquisition du fer est induite par la présence du sidérophore associé, la culture est supplémentée avec 10 µM ou 100 µM de la molécule d'intérêt. Après une culture sur la nuit à 30°C et sous agitation (220 rpm), les cultures bactériennes sont diluées à une DO à 600 nm de 1 dans un volume de 900 µL de milieu CAA et mises à incuber pendant 15 min en absence ou en présence de 200 µM de CCCP, un inhibiteur de la force proton motrice.

Les complexes sidérophores-<sup>55</sup>Fe sont préparés à une concentration de 50 µM en <sup>55</sup>Fe dans une solution de HCl 0,1 N avec un ratio sidérophore : fer (mol : mol) de 20 : 1. Le mélange sidérophore-<sup>55</sup>Fe est incubé pendant 15 min à température ambiante pour laisser le complexe se former. Dans ces conditions d'excès en sidérophores, tout le <sup>55</sup>Fe est chélaté par les sidérophores, ce qui empêche la formation d'hydroxyde de fer qui est connu pour précipiter. Les complexes sidérophores-<sup>55</sup>Fe sont ajoutés à la solution bactérienne à une concentration finale de 500 nM. À différents temps d'incubation (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 180 minutes), 100 µL de solution sont prélevés et transférés dans un tube Eppendorf placé sur glace et contenant 100 µL de CAA à 0°C, stoppant ainsi tout transport de <sup>55</sup>Fe dans les cellules. Les tubes sont centrifugés pendant 2 min à 13000 rpm, puis les

culots bactériens sont transférés dans des fioles à scintillation où 1 mL de liquide de scintillation est rajouté. Après 1 h d'incubation à l'obscurité, les fioles sont placées dans un analyseur à scintillation liquide Tri-Carb (Tri-Carb 5110TR, Perkin Elmer) permettant de mesurer la radioactivité présente dans le culot bactérien.

## 4 Suivi de l'expression des TBDTs au sein du biofilm

Les rapporteurs fluorescents plasmidiques *P. aeruginosa* ( $P_{tbdT}$ - $\gamma$ pet  $P_{pilM}$ -*mCherry*) sont initialement cultivés dans 5 mL de milieu LB à 30°C et sous agitation (220 rpm) sur la nuit. Les cellules sont lavées avec du milieu CAA, puis la DO à 600 nm est ajustée à 0,01 dans 5 mL de milieu CAA et 270  $\mu$ L de la dilution bactérienne est distribuée dans une  $\mu$ -plaque 8 puits (IBIDI uncoated). Les cultures bactériennes sont cultivées au cours du temps à 30°C, sous faible agitation (30 rpm, pour permettre une meilleure oxygénation du milieu) et en absence ou en présence de 10  $\mu$ M d'ENT ou de 100  $\mu$ M de NOCA. Le surnageant bactérien est récupéré tous les jours et remplacé par du milieu CAA en absence ou en présence de 10  $\mu$ M d'ENT ou de 100  $\mu$ M de NOCA pour supprimer l'ensemble des cellules non adhérentes. Les surnageants récupérés sont filtrés avec une membrane 0,22  $\mu$ M et placés à -20°C pour une quantification ultérieure des sidérophores endogènes.

Après 2, 4 et 6 jours de culture, le surnageant est retiré et récupéré et le biofilm est fixé par ajout de 200  $\mu$ L de paraformaldéhyde (PFA) 4% (Sigma-Aldrich) pendant 20 min. Le biofilm formé est marqué par ajout de 200  $\mu$ L de DAPI à 1  $\mu$ g/mL (Thermo Scientific) pendant 20 min à l'abri de la lumière. Le biofilm est ensuite resuspendu dans 200  $\mu$ L de PBS 1X et visualisé au microscope confocal (LEICA SPE) au grossissement X63 (12 bits, zoom 1,5, intensité du laser de 12 %, Z stack de 0,3  $\mu$ M). Le biofilm (cellules et matrice extracellulaire) est visualisé par marquage au DAPI (ex : 358 nm, em : 461 nm), les cellules individuelles sont visualisées par l'expression de *mCherry* (ex : 587 nm, em : 610 nm) et l'expression du TBDT d'intérêt par l'expression de *Ypet* (ex : 500 nm, em : 540 nm). Les images acquises sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ (FIJI distribution). Les canaux DAPI, *mCherry* et *Ypet* sont séparés pour une analyse individuelle de chaque signal de fluorescence. Des images composites (merged) et des vues orthogonales, reconstruites à partir des Z-stacks, sont générées afin d'évaluer l'épaisseur du biofilm, la colocalisation des signaux fluorescents et leur organisation spatiale au sein du biofilm.

## 5 Analyse transcriptomique et protéomique chez *P. aeruginosa*

### 5.1 Préparation des échantillons

Les cellules de *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  sont cultivées pendant 24 h en milieu LB, suivi par une culture sur la nuit en milieu CAA selon le protocole décrit ci-dessus. La culture bactérienne est ensuite lavée et diluée dans 5 mL de milieu CAA frais à une DO à 600 nm de 0,1 en présence ou en absence du sidérophore d'intérêt. Les cultures sont placées pendant 8 h à 30°C et sous agitation (220 rpm), permettant ainsi la modulation de l'expression des systèmes d'acquisition du fer en réponse à la présence du sidérophore d'intérêt. Dans le cas d'une préparation d'échantillons pour une analyse par protéomique différentielle, un volume correspondant à  $5 \times 10^8$  cellules est prélevé de chaque culture et centrifugé pendant 3 min à 8500 rpm. Les culots bactériens sont conservés à -80°C avant analyse. Dans le cas d'une préparation d'échantillons pour une PCR quantitative en temps réel, un volume correspondant à  $2,5 \times 10^8$  cellules est prélevé de chaque culture auquel sont rajoutés deux volumes de RNAProtect Bacterial Reagent (Qiagen). Après une incubation de 5 min à température ambiante, les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 5000 g, les culots sont séchés et conservés à -80°C avant analyse. L'expérience est réalisée en triplicat pour chaque échantillon et dans chaque condition de culture.

### 5.2 Analyse protéomique différentielle

Les culots bactériens sont repris dans 200  $\mu$ L de tampon de lyse UTCT contenant 7 M d'urée, 2 M de thiourée, 4% de CHAPS, 20 mM de Tris-HCl à pH 7,6 et supplémenté de DNase et nucléase. La concentration protéique de chaque échantillon lysé est déterminée par dosage Bradford en utilisant comme standard une gamme de concentration d'albumine sérique bovine (BSA). Pour chaque échantillon, 10  $\mu$ g de protéines sont précipitées sur la nuit dans une solution glaciale de méthanol 100 % contenant 0,1 M d'acétate d'ammonium (5 volumes, -20°C). Après une centrifugation de 15 min à 12000 g et 4°C, les culots sont lavés deux fois dans une solution de méthanol 80% contenant 0,1 M d'acétate d'ammonium et séchés sous vide (système de concentration sous vide Speed-Vac, Fisher Scientific). Les culots sont repris dans 100  $\mu$ L de bicarbonate d'ammonium à 50 mM, les ponts disulfures sont réduits (5 mM de dithiothréitol, 95°C, 10 min) et les fonctions thiols alkylées (10 mM

d'iodoacétamide, température ambiante, 20 min). Les protéines sont ensuite digérées sur la nuit avec 150 ng de trypsine (Promega).

L'analyse des peptides a été réalisée sur deux types d'appareils injectant 1000 ng du mélange peptidique :

- Un spectromètre de masse TripleTOF 5600 (Sciex) couplé à un système de chromatographie liquide U3000-RSLC (Thermo Fisher Scientific) pour les échantillons en présence ou en absence de ferricrocine, des dérivés de la PCH, des sidérophores de type carboxylate et des sidérophores mixtes hydroxycarboxylate/hydroxamates dans le cas des articles n°1, 2 et 3 (Will *et al.*, 2023, 2024, 2025) ;
- Un spectromètre de masse TIMS-TOF Pro 2 (Bruker Daltonik GmbH) couplé à un système de chromatographie liquide en phase inverse nanoElute 2 pour les échantillons en présence ou en absence de RHODO et de ferrichrysine dans le cas de l'article n°1 (Will *et al.*, 2024).

Les données brutes sont ensuite converties en format mgf à l'aide du logiciel Proteome Discoverer Daemon (Thermo-Fischer Scientific, script « Export-to-mgf », v.2.2) et criblées contre la banque de données UniProtKB pour la souche *P. aeruginosa* PAO1 en utilisant une stratégie de leurre. Les peptides et les protéines sont identifiées à l'aide de l'algorithme Mascot (Matrix Science, version 2.5.1) en utilisant les paramètres suivants : (a) Sélection de l'enzyme Trypsine/P; (b) deux clivages manqués permis ; (c) carbamidométhylation des cystéines en modification fixe ; (d) oxydation de la méthionine et acétylation de l'extrémité N-term de la protéine en modification variable et (e) tolérance de masse des ions précurseurs fixée à 0,02 Da et 10 ppm pour les ions fragmentés. Les données Mascot sont importées dans le logiciel Proline v.1.4 (<http://www.profiroteomics.fr/proline/>). Les protéines identifiées sont validées lorsque le rang Mascott est égal à 1 et pour un FDR de 1% pour les correspondances entre les spectres peptidiques (score PSM) et les sets protéiques (Protein set score). Une P-valeur ajustée est calculée par la procédure de Benjamini-Hochsberg ainsi qu'un fold change (FC) pour chaque protéine identifiée.

### 5.3 PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative par transcription inverse (qRT-PCR) est utilisée pour évaluer la transcription spécifique de gènes d'intérêt. L'ARN total est d'abord extrait du culot avec le kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur puis l'ARN est quantifié par spectrométrie UV en

utilisant le Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific). La quantification de l'ADNc spécifique est réalisée selon deux méthodes :

- Dans le cas des dérivés de la PCH, 1  $\mu\text{g}$  de l'ARN total est rétrotranscrit avec le kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems) en suivant les instructions du fournisseur (1 h à 37°C puis 5 min à 95°C). 20 ng d'ADNc spécifique sont quantifiés pour chaque échantillon avec le thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems), en utilisant les primers adéquats et le mélange Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems). Les niveaux de transcrits de chaque gène d'intérêt sont normalisés contre ceux de *uvrD* et exprimés sous la forme d'un rapport  $\log_2$  (FC) par rapport à la condition de référence.
- Dans le cas des autres sidérophores étudiés, l'ARN total (1  $\mu\text{g}$ ) est rétrotranscrit avec le kit iScript cDNA Synthesis (Bio-rad) en suivant les instructions du fournisseur (5 min à 25°C, 20 min à 46°C puis 1 min à 95°C). 20 ng d'ADNc spécifique sont quantifiés avec le thermocycleur CFX Opus 96 (Bio-rad), en utilisant les primers adéquats et le mélange iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad). Les niveaux de transcrits de chaque gène d'intérêt sont normalisés contre ceux de *uvrD* et *rpsL* et sont exprimés sous la forme d'un rapport  $\log_2$  (FC) par rapport à la condition de référence.

## 6 Caractérisation des sidérophores

### 6.1 Quantification de la pyoverdine (PVD)

La PVD produite par des cultures de *P. aeruginosa* en biofilm est quantifiée en récupérant les surnageants des cultures bactériennes au cours du temps. Les surnageants sont filtrés à l'aide d'une membrane 0,22  $\mu\text{m}$ , dilués au  $\frac{1}{4}$  dans du milieu CAA et placés dans une cuve en quartz pour réaliser un spectre d'absorbance (300 à 500 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre UV. La concentration en PVD est calculée en suivant la loi de Beer-Lambert :  $A = \epsilon l C$  où  $A$  est l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire (pour la PVD,  $\epsilon = 16500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 400 nm),  $l$  le trajet de la lumière (ici égal à 1 cm) et  $C$  la concentration en PVD dans notre échantillon (Albrecht-Gary *et al.*, 1994; Hoegy *et al.*, 2014).

## 6.2 Quantification de la pyochéline (PCH)

Après récupération des surnageants des cultures au cours du temps, 3 mL de surnageant de culture sont filtrés, puis acidifiés en ajoutant 150  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acide citrique saturée. La PCH est extraite par l'ajout d'1,2 mL d'acétate d'éthyl. La phase organique contenant la PCH extraite est placée dans une cuve en quartz pour réaliser un spectre d'absorbance (250 à 500 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre UV. La concentration en PCH dans les différentes conditions de culture est calculée en suivant la loi de Beer-Lambert :  $A = \epsilon l C$  où  $A$  est l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire (pour la PCH,  $\epsilon = 4900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 313 nm),  $l$  le trajet de la lumière (ici égal à 1 cm) et  $C$  la concentration en PCH dans notre échantillon (Hoegy *et al.*, 2014).

## 6.3 Profilage métabolique par spectrométrie de masse

Les cellules de *P. aeruginosa*  $\Delta pvdF\Delta pchA$  sont initialement cultivées pendant 24 h dans 5 mL de milieu LB, suivies d'une culture de 24 h à 30°C dans le milieu CAA. Les bactéries sont récupérées par centrifugation puis diluées dans le milieu CAA à une DO à 600 nm de 0,1 et mises à 30°C sous agitation (220 rpm) pendant 15 h en présence ou en absence de 10  $\mu\text{M}$  de PCH. Les cultures sont culotées pour récupérer le surnageant. Le surnageant est filtré à l'aide d'une membrane de 0,22  $\mu\text{m}$ , acidifié et extrait avec du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée et évaporée sous vide. Les échantillons obtenus sont ensuite dissous dans 1 mL de MeOH, et un volume de 2,5  $\mu\text{L}$  est injecté pour le profilage métabolique (les conditions chromatographiques sont décrites en détail dans le « Matériel et Méthodes » de l'article n°3 (Will *et al.*, 2025)). L'analyse qualitative d'un groupe de composés apparentés est réalisée en suivant les chromatogrammes d'ions extraits en charge positive et négative. Chaque ion ciblé est extrait avec une variation maximale de 0,04 unité de masse atomique. Pour supposer la présence ou l'absence d'un ion ciblé, un ajustement théorique est réalisé avec le profil mono-isotopique expérimental à la résolution donnée par le spectromètre de masse.

# Bibliographie

Abergel, R.J., Clifton, M.C., Pizarro, J.C., Warner, J.A., Shuh, D.K., Strong, R.K., and Raymond, K.N. (2008) The Siderocalin/Enterobactin Interaction: A Link between Mammalian Immunity and Bacterial Iron Transport. *J Am Chem Soc* **130**: 11524–11534.

Aguilar, G.R., Swetschinski, L.R., Weaver, N.D., Ikuta, K.S., Mestrovic, T., Gray, A.P., et al. (2023) The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. *Lancet Reg Health – Am* **25**:

Aisen, P., Leibman, A., and Zweier, J. (1978) Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem* **253**: 1930–1937.

Akers, H.A. (1983) Isolation of the Siderophore Schizokinen from Soil of Rice Fields. *Appl Environ Microbiol* **45**: 1704–1706.

Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A.Z., and Abdallah, M.A. (1994) Bacterial Iron Transport: Coordination Properties of Pyoverdin PaA, a Peptidic Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* **33**: 6391–6402.

Alejandre-Castañeda, V., Patiño-Medina, J.A., Valle-Maldonado, M.I., Nuñez-Anita, R.E., Santoyo, G., Castro-Cerritos, K.V., et al. (2022) Secretion of the siderophore rhizoferrin is regulated by the cAMP-PKA pathway and is involved in the virulence of *Mucor lusitanicus*. *Sci Rep* **12**: 10649.

Anderegg, G., L'Eplattenier, F., and Schwarzenbach, G. (1963a) Hydroxamatkomplexe II. Die Anwendung der pH-Methode. *Helv Chim Acta* **46**: 1400–1408.

Anderegg, G., L'Eplattenier, F., and Schwarzenbach, G. (1963b) Hydroxamatkomplexe III. Eisen(III)-Austausch zwischen Sideraminen und Komplexonen. Diskussion der Bildungskonstanten der Hydroxamatkomplexe. *Helv Chim Acta* **46**: 1409–1422.

Andrews, N. and Schmidt, P.J. (2007) Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol* **69**:

Ankenbauer, R.G. and 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.

Archibald, F. (1983) *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol Lett* **19**: 29–32.



Bachman, M.A., Lenio, S., Schmidt, L., Oyler, J.E., and Weiser, J.N. (2012) Interaction of Lipocalin 2, Transferrin, and Siderophores Determines the Replicative Niche of *Klebsiella pneumoniae* during Pneumonia. *mBio* 3: 10.1128/mbio.00224-11.

Balasubramanian, D., Kumari, H., Jaric, M., Fernandez, M., Turner, K.H., Dove, S.L., et al. (2014) Deep sequencing analyses expands the *Pseudomonas aeruginosa* AmpR regulon to include small RNA-mediated regulation of iron acquisition, heat shock and oxidative stress response. *Nucleic Acids Res* 42: 979–998.

Bandyra, K.J., Said, N., Pfeiffer, V., Góna, M.W., Vogel, J., and 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.

Banin, E., Brady, K.M., and Greenberg, E.P. (2006) Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Appl Environ Microbiol* 72: 2064–2069.

Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11076–11081.

Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M.R., and Harwood, C.S. (2012) The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res* 40: 7207–7218.

Barbier, F. and Wolff, M. (2010) Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* - Vers l'impasse thérapeutique ? *médecine/sciences* 26: 960–968.

Barker, K.D., Barkovits, K., and Wilks, A. (2012) Metabolic flux of extracellular heme uptake in *Pseudomonas aeruginosa* is driven by the iron-regulated heme oxygenase (HemO). *J Biol Chem* 287: 18342–18350.

Bartholomä, M.D., Louie, A.S., Valliant, J.F., and Zubieta, J. (2010) Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era. *Chem Rev* 110: 2903–2920.

Bastos, R.W., Akiyama, D., Dos Reis, T.F., Colabardini, A.C., Luperini, R.S., de Castro, P.A., et al. (2022) Secondary Metabolites Produced during *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *mBio* 13: e0185022.

Bearden, S.W., Fetherston, J.D., and Perry, R.D. (1997) Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **65**: 1659–1668.

Behrens, H.M., Lowe, E.D., Gault, J., Housden, N.G., Kaminska, R., Weber, T.M., et al. (2020) Pyocin S5 Import into *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Generic Mode of Bacteriocin Transport. *mBio* **11**: e03230-19.

Bhamidimarri, S.P., Young, T.R., Shanmugam, M., Soderholm, S., Baslé, A., Bumann, D., and Berg, B. van den (2021) Acquisition of ionic copper by the bacterial outer membrane protein OprC through a novel binding site. *PLOS Biol* **19**: e3001446.

Bonneau, A., Roche, B., and 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.

Boukhalfa, H. and Crumbliss, A.L. (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **15**: 325–339.

Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., and 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.

Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2009) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J Bacteriol* **191**: 3517–3525.

Braun, V., Hartmann, M.D., and 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.

Braun, V. and Killmann, H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**: 104–109.

Bredenbruch, F., Geffers, R., Nimtz, M., Buer, J., and Häussler, S. (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ Microbiol* **8**: 1318–1329.

Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., and Lory, S. (2009) The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol* **73**: 434–445.

Briard, B., Mislin, G.L.A., Latgé, J.-P., and Beauvais, A. (2019) Interactions between *Aspergillus fumigatus* and Pulmonary Bacteria: Current State of the Field, New Data, and Future Perspective. *J Fungi* 5: 48.

Brillet, K., Journet, L., Célia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., and Cobessi, D. (2007) A  $\beta$  Strand Lock Exchange for Signal Transduction in TonB-Dependent Transducers on the Basis of a Common Structural Motif. *Structure* 15: 1383–1391.

Brillet, K., Ruffenach, F., Adams, H., Journet, L., Gasser, V., Hoegy, F., et al. (2012) An ABC Transporter with Two Periplasmic Binding Proteins Involved in Iron Acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol* 7: 2036–2045.

Büttner, H., Hörl, J., Krabbe, J., and Hertweck, C. (2023) Discovery and Biosynthesis of Anthrochelin, a Growth-Promoting Metallophore of the Human Pathogen *Luteibacter anthropi*. *ChemBioChem* 24: e202300322.

Cadieux, N., Phan, P.G., Cafiso, D.S., and Kadner, R.J. (2003) Differential substrate-induced signaling through the TonB-dependent transporter BtuB. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10688–10693.

Cai, Y., Hutchin, A., Craddock, J., Walsh, M.A., Webb, J.S., and Tews, I. (2020) Differential impact on motility and biofilm dispersal of closely related phosphodiesterases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 10: 6232.

Carrano, C.J., Cooper, S.R., and Raymond, K.N. (1979) Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 11. Solution equilibriums and electrochemistry of ferric rhodotorulate complexes. *J Am Chem Soc* 101: 599–604.

Carrano, C.J., Drechsel, H., Kaiser, D., Jung, G., Matzanke, B., Winkelmann, G., et al. (1996) Coordination Chemistry of the Carboxylate Type Siderophore Rhizoferrin: The Iron(III) Complex and Its Metal Analogs. *Inorg Chem* 35: 6429–6436.

Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J., and Andrews, S.C. (2006) Feo – Transport of Ferrous Iron into Bacteria. *BioMetals* 19: 143–157.

Cashin, P., Goldsack, L., Hall, D., and O’Toole, R. (2006) Contrasting signal transduction mechanisms in bacterial and eukaryotic gene transcription. *FEMS Microbiol Lett* 261: 155–164.

Catel-Ferreira, M., Marti, S., Guillon, L., Jara, L., Coadou, G., Molle, V., et al. (2016) The outer membrane porin OmpW of *Acinetobacter baumannii* is involved in iron uptake and colistin binding. *FEBS Lett* 590: 224–231.

Celia, H., Botos, I., Ni, X., Fox, T., De Val, N., Lloubes, R., et al. (2019) Cryo-EM structure of the bacterial Ton motor subcomplex ExbB–ExbD provides information on structure and stoichiometry. *Commun Biol* 2: 1–6.

Celia, H., Noinaj, N., Zakharov, S.D., Bordignon, E., Botos, I., Santamaria, M., et al. (2016) Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature* 538: 60–65.

Centola, G., Deredge, D.J., Hom, K., Ai, Y., Dent, A.T., Xue, F., and Wilks, A. (2020) Gallium(III)–Salophen as a Dual Inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* Heme Sensing and Iron Acquisition. *ACS Infect Dis* 6: 2073–2085.

Cescau, S., Cwerman, H., Létoffé, S., Delepelaire, P., Wandersman, C., and Biville, F. (2007) Heme acquisition by hemophores. *BioMetals* 20: 603–613.

Chan, D.C.K. and Burrows, L.L. (2022) *Pseudomonas aeruginosa* FpvB Is a High-Affinity Transporter for Xenosiderophores Ferrichrome and Ferrioxamine B. *mBio* e03149-22.

Chan, D.C.K., Josts, I., Koteva, K., Wright, G.D., Tidow, H., and Burrows, L.L. (2023) Interactions of TonB-dependent transporter FoxA with siderophores and antibiotics that affect binding, uptake, and signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 120: e2221253120.

Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., et al. (2017) Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev* 41: 698–722.

Chimento, D.P., Kadner, R.J., and Wiener, M.C. (2003) The *Escherichia coli* outer membrane cobalamin transporter BtuB: structural analysis of calcium and substrate binding, and identification of orthologous transporters by sequence/structure conservation. *J Mol Biol* 332: 999–1014.

Chourashi, R. and Oglesby, A.G. (2024) Iron starvation increases the production of the *Pseudomonas aeruginosa* RsmY and RsmZ sRNAs in static conditions. *J Bacteriol* e0027823.

Chuljerm, H., Chen, Y.-L., Srichairatanakool, S., Hider, R.C., and Cilibrizzi, A. (2019) Synthesis and iron coordination properties of schizokinen and its imide derivative. *Dalton Trans Camb Engl* 2003 48: 17395–17401.

Cianfanelli, F.R., Cunrath, O., and Bumann, D. (2020) Efficient dual-negative selection for bacterial genome editing. *BMC Microbiol* 20: 129.

Ciofu, O., Hansen, C.R., and Høiby, N. (2013) Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 19: 251.

Clément, E., Mesini, P.J., Pattus, F., and Schalk, I.J. (2004) The Binding Mechanism of Pyoverdinin with the Outer Membrane Receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Its Iron-Loaded Status. *Biochemistry* **43**: 7954–7965.

Cobessi, D., Celia, H., and 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.

Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., and Parsek, M.R. (2011) The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **7**: e1001264.

Cooper, J.D., Hannauer, M., Marolda, C.L., Briere, L.-A.K., and Heinrichs, D.E. (2014) Identification of a positively charged platform in *Staphylococcus aureus* HtsA that is essential for ferric staphyloferrin A transport. *Biochemistry* **53**: 5060–5069.

Cornelis, P. (2020) Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. *MicrobiologyOpen* **9**: e962.

Cornelis, P. and Bodilis, J. (2009) A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environ Microbiol Rep* **1**: 256–262.

Cornelis, P. and Dingemans, J. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 75.

Cornish, A.S. and Page, W.J. (2000) Role of Molybdate and Other Transition Metals in the Accumulation of Protochelin by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1580–1586.

Cox, C.D. (1980) Iron uptake with ferripyochelin and ferric citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **142**: 581–587.

Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L., and Cook, J.C. (1981) Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **78**: 4256–4260.

Crosa, J.H. and Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **66**: 223–249.

Cuív, P.Ó., Clarke, P., and 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.

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

Cunrath, O., Gasser, V., Hoegy, F., Reimmann, C., Guillon, L., and Schalk, I.J. (2015) A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **17**: 171–185.

Cunrath, O., Geoffroy, V.A., and Schalk, I.J. (2016) Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. *Environ Microbiol* **18**: 3258–3267.

Cunrath, O., Graulier, G., Carballido-Lopez, A., Pérard, J., Forster, A., Geoffroy, V.A., et al. (2020) The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* optimizes the production of the siderophore pyochelin upon environmental challenges. *Metallomics* **12**: 2108–2120.

Cystic fibrosis trust (2022) UK Cystic Fibrosis Registry Annual Data Report 2022.

Davies, K.J.P., Lloyd, D., and Boddy, L. (1989) The Effect of Oxygen on Denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **135**: 2445–2451.

De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., and Barry, C.E. (1999) Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *J Bacteriol* **181**: 4443–4451.

Dean, C.R., Neshat, S., and Poole, K. (1996) PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**: 5361–5369.

Dean, C.R. and Poole, K. (1993) Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (pfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**: 317–324.

Dent, A.T., Mouriño, S., Huang, W., and 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.

Díaz-Pérez, S.P., Solis, C.S., López-Bucio, J.S., Valdez Alarcón, J.J., Villegas, J., Reyes-De la Cruz, H., and Campos-García, J. (2022) Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation. *Microb Ecol.*

Diggle, S.P., Matthijs, S., Wright, V.J., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Lamont, I.L., et al. (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. *Chem Biol* **14**: 87–96.

Domenico, I.D., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2011) Hepcidin and Ferroportin: The New Players in Iron Metabolism. *Semin Liver Dis* 31: 272–279.

D’Orazio, M., Mastropasqua, M.C., Cerasi, M., Pacello, F., Consalvo, A., Chirullo, B., et al. (2015) The capability of *Pseudomonas aeruginosa* to recruit zinc under conditions of limited metal availability is affected by inactivation of the ZnuABC transporter†. *Metallomics* 7: 1023–1035.

Drago-Serrano, M.E., Campos-Rodríguez, R., Carrero, J.C., and de la Garza, M. (2017) Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections. *Int J Mol Sci* 18: 501.

Ducret, V., Gonzalez, D., Leoni, S., Valentini, M., and Perron, K. (2023) A Zur-mediated transcriptional regulation of the zinc export system in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 23: 6.

Dumas, Z., Ross-Gillespie, A., and Kümmerli, R. (2013) Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments. *Proc R Soc B Biol Sci* 280: 20131055.

Elias, S., Degtyar, E., and Banin, E. (2011) FvbA is required for vibriobactin utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 157: 2172–2180.

Escolar, L., Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181: 6223–6229.

Essén, S.A., Johnsson, A., Bylund, D., Pedersen, K., and Lundström, U.S. (2007) Siderophore Production by *Pseudomonas stutzeri* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Appl Environ Microbiol* 73: 5857–5864.

European Centre for Disease Prevention and Control (2021) Healthcare-associated infections acquired in intensive care units - Annual epidemiological report 2021. 2024.

Evans, L.R. and Linker, A. (1973) Production and Characterization of the Slime Polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 116: 915–924.

Farmer, K.L. and Thomas, M.S. (2004) Isolation and Characterization of *Burkholderia cenocepacia* Mutants Deficient in Pyochelin Production: Pyochelin Biosynthesis Is Sensitive to Sulfur Availability. *J Bacteriol* 186: 270–277.

Fazli, M., Bjamsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jørgensen, B., Andersen, A.S., Kroghfelt, K.A., et al. (2009) Nonrandom Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Chronic Wounds. *J Clin Microbiol* 47: 4084–4089.



Fenton, H.J.H. (1894) LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans* **65**: 899–910.

Ferguson, A.D., Braun, V., Fiedler, H.-P., Coulton, J.W., Diederichs, K., and Welte, W. (2000) Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Sci* **9**: 956–963.

Ferguson, A.D., Chakraborty, R., Smith, B.S., Esser, L., van der Helm, D., and Deisenhofer, J. (2002) Structural Basis of Gating by the Outer Membrane Transporter FecA. *Science* **295**: 1715–1719.

Fernandez-López, R., Ruiz, R., de la Cruz, F., and Moncalián, G. (2015) Transcription factor-based biosensors enlightened by the analyte. *Front Microbiol* **6**.

Ferreira, J.A.G., Penner, J.C., Moss, R.B., Haagensen, J.A.J., Clemons, K.V., Spormann, A.M., et al. (2015) Inhibition of *Aspergillus fumigatus* and Its Biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on the Source, Phenotype and Growth Conditions of the Bacterium. *PLoS One* **10**: e0134692.

Ferry, M., Ferriz, H., Sharp, C., Paschalidis, C., Boutant, E., Schalk, I.J., and Cunrath, O. (2024) Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa*'s metal-responsive TonB-dependent transporters. 2024.10.14.618150.

Fiedler, H.P., Krastel, P., Müller, J., Gebhardt, K., and Zeeck, A. (2001) Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by Streptomyces species.(1). *FEMS Microbiol Lett* **196**: 147–151.

Fischbach, M.A., Lin, H., Liu, D.R., and Walsh, C.T. (2006) How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat Chem Biol* **2**: 132–138.

Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623–633.

Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., et al. (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**: 917–921.

Fluckinger, M., Haas, H., Merschak, P., Glasgow, B.J., and Redl, B. (2004) Human Tear Lipocalin Exhibits Antimicrobial Activity by Scavenging Microbial Siderophores. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3367–3372.

Frangipani, E., Visaggio, D., Heeb, S., Kaever, V., Cámara, M., Visca, P., and Imperi, F. (2014) The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **16**: 676–688.

- Frey, P.A. and Reed, G.H. (2012) The Ubiquity of Iron. *ACS Chem Biol* 7: 1477–1481.
- Friedman, L. and Kolter, R. (2004) Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *J Bacteriol* 186: 4457–4465.
- Gaille, C., Reimmann, C., and Haas, D. (2003) Isochorismate Synthase (PchA), the First and Rate-limiting Enzyme in Salicylate Biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*\*. *J Biol Chem* 278: 16893–16898.
- Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., and 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.
- Garcia-Herrero, A. and Vogel, H.J. (2005) Nuclear magnetic resonance solution structure of the periplasmic signalling domain of the TonB-dependent outer membrane transporter FecA from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 58: 1226–1237.
- García-Reyes, S., Soberón-Chávez, G., and 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.
- Garibaldi, J.A. and Neilands, J.B. (1956) Formation of iron-binding compounds by micro-organisms. *Nature* 177: 526–527.
- Gasser, V., Baco, E., Cunrath, O., August, P.S., Perraud, Q., Zill, N., et al. (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.
- Gasser, V., Kuhn, L., Hubert, T., Aussel, L., Hammann, P., and 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.
- Gessard, C. (1882) Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. By Carle Gessard (1850-1925). *Rev Infect Dis* 6 Suppl 3: S775-776.
- Ghafoor, A., Hay, I.D., and Rehm, B.H.A. (2011) Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol* 77: 5238–5246.

Ghssein, G., Brutesco, C., Ouerdane, L., Fojcik, C., Izaute, A., Wang, S., et al. (2016) Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in *Staphylococcus aureus*. *Science* **352**: 1105–1109.

Ghysels, B., Dieu, B.T.M., Beatson, S.A., Pirnay, J.-P., Ochsner, U.A., Vasil, M.L., and Cornelis, P. (2004) FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl* **150**: 1671–1680.

Ghysels, B., Ochsner, U., Möllman, U., Heinisch, L., Vasil, M., Cornelis, P., and Matthijs, S. (2005) The *Pseudomonas aeruginosa* pirA gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. *FEMS Microbiol Lett* **246**: 167–174.

Gibson, F. and Magrath, D.I. (1969) The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-I. *Biochim Biophys Acta* **192**: 175–184.

Gomez, N.O., Tetard, A., Ouerdane, L., Laffont, C., Brutesco, C., Ball, G., et al. (2021) Involvement of the *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-OprM efflux pump in the secretion of the metallophore pseudopaline. *Mol Microbiol* **115**: 84–98.

Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D.H., Kucharski, L.M., Maguire, M.E., and Rensing, C. (2005) The Metal Permease ZupT from *Escherichia coli* Is a Transporter with a Broad Substrate Spectrum. *J Bacteriol* **187**: 1604–1611.

Greenwald, J., Zeder-Lutz, G., Hagege, A., Celia, H., and Pattus, F. (2008) The Metal Dependence of Pyoverdine Interactions with Its Outer Membrane Receptor FpvA. *J Bacteriol* **190**: 6548–6558.

Griffin, A.S., West, S.A., and Buckling, A. (2004) Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature* **430**: 1024–1027.

Grinter, R. and Lithgow, T. (2019) The structure of the bacterial iron–catecholate transporter Fiu suggests that it imports substrates via a two-step mechanism. *J Biol Chem* **294**: 19523–19534.

Große, C., Scherer, J., Koch, D., Otto, M., Taudte, N., and Grass, G. (2006) A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**: 120–131.

Gudmundsdottir, A., Bell, P.E., Lundrigan, M.D., Bradbeer, C., and Kadner, R.J. (1989) Point mutations in a conserved region (TonB box) of *Escherichia coli* outer membrane protein BtuB affect vitamin B12 transport. *J Bacteriol* **171**: 6526–6533.

Guillon, L., El Mecherki, M., Altenburger, S., Graumann, P.L., and 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.

Haber, F., Weiss, J., and Pope, W.J. (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond Ser - Math Phys Sci* **147**: 332–351.

Han, Y., Wang, T., Chen, G., Pu, Q., Liu, Q., Zhang, Y., et al. (2019) A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. *PLOS Pathog* **15**: e1008198.

Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G.L.A., Shanzer, A., and Schalk, I.J. (2010) The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome. *J Bacteriol* **192**: 1212–1220.

Hannauer, M., Schäfer, M., Hoegy, F., Gizzi, P., Wehrung, P., Mislin, G.L.A., et al. (2012) Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. *FEBS Lett* **586**: 96–101.

Harrison, F. and Buckling, A. (2009) Cooperative production of siderophores by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Biosci Landmark Ed* **14**: 4113–4126.

Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. In *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 47–110.

Hernlem, B.J., Vane, L.M., and Sayles, G.D. (1996) Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations. *Inorganica Chim Acta* **244**: 179–184.

Hider, R.C. (1984) Siderophore mediated absorption of iron. In *Siderophores from Microorganisms and Plants*. Chimiak, A., Hider, R. C., Liu, A., Neilands, J.B., Nomoto, K., and Sugiura, Y. (eds). Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 25–87.

Hider, R.C. and Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* **27**: 637–657.

Higgs, P.I., Larsen, R.A., and Postle, K. (2002) Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol Microbiol* **44**: 271–281.

Hirsch, E.B. and Tam, V.H. (2010) Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* **10**: 441–451.

Hoang, T.-M., Huang, W., Gans, J., Weiner, J., Nowak, E., Barbier, M., et al. (2023) The heme-responsive PrrH sRNA regulates *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin gene expression. *mSphere* e0039223.

Hoegy, F., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2014) Pyoverdine and Pyochelin Measurements. In *Pseudomonas Methods and Protocols*. Filloux, A. and Ramos, J.-L. (eds). New York, NY: Springer, pp. 293–301.

Hubert, T., Madec, M., and Schalk, I.J. (2023) Experimental and computational methods to highlight behavioural variations in TonB-dependent transporter expression in *Pseudomonas aeruginosa* versus siderophore concentration. *Sci Rep* 13: 20015.

Hunter, R.C., Asfour, F., Dingemans, J., Osuna, B.L., Samad, T., Malfroot, A., et al. (2013) Ferrous Iron Is a Significant Component of Bioavailable Iron in Cystic Fibrosis Airways. *mBio* 4: 10.1128/mbio.00557-13.

Imperi, F., Tiburzi, F., and Visca, P. (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 20440–20445.

Imperi, F. and Visca, P. (2013) Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of *Pseudomonas aeruginosa*: a membrane-associated “siderosome.” *FEBS Lett* 587: 3387–3391.

Izoré, T. and Cryle, M.J. (2018) The many faces and important roles of protein–protein interactions during non-ribosomal peptide synthesis. *Nat Prod Rep* 35: 1120–1139.

Jenul, C., Keim, K.C., Jens, J.N., Zeiler, M.J., Schilcher, K., Schurr, M.J., et al. (2023) Pyochelin biotransformation by *Staphylococcus aureus* shapes bacterial competition with *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial infections. *Cell Rep* 42: 112540.

Johnson, J.R., Moseley, S.L., Roberts, P.L., and Stamm, W.E. (1988) Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infect Immun* 56: 405–412.

Josts, I., Veith, K., Normant, V., Schalk, I.J., and Tidow, H. (2021) Structural insights into a novel family of integral membrane siderophore reductases. *Proc Natl Acad Sci* 118: e2101952118.

Josts, I., Veith, K., and 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.

Jurkevitch, E., Hadar, Y., and Chen, Y. (1992) Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Appl Environ Microbiol* **58**: 119–124.

Jurkevitch, E., Hadar, Y., Chen, Y., Libman, J., and Shanzer, A. (1992) Iron uptake and molecular recognition in *Pseudomonas putida*: receptor mapping with ferrichrome and its biomimetic analogs. *J Bacteriol* **174**: 78–83.

Kaplan, A.R., Musaev, D.G., and Wuest, W.M. (2021) Pyochelin Biosynthetic Metabolites Bind Iron and Promote Growth in Pseudomonads Demonstrating Siderophore-like Activity. *ACS Infect Dis* **7**: 544–551.

Kavita, K., de Mets, F., and Gottesman, S. (2018) New aspects of RNA-based regulation by Hfq and its partner sRNAs. *Curr Opin Microbiol* **42**: 53–61.

Kay, E., Humair, B., Dénervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., et al. (2006) Two GacA-Dependent Small RNAs Modulate the Quorum-Sensing Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 6026–6033.

Kelly, B.T., Pennington, K.M., and Limper, A.H. (2020) Advances in the diagnosis of fungal pneumonias. *Expert Rev Respir Med*.

Khan, A., Singh, P., and Srivastava, A. (2018) Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiol Res* **212–213**: 103–111.

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**: 1511–1524.

Konings, A.F., Martin, L.W., Sharples, K.J., Roddam, L.F., Latham, R., Reid, D.W., and Lamont, I.L. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* Uses Multiple Pathways To Acquire Iron during Chronic Infection in Cystic Fibrosis Lungs. *Infect Immun* **81**: 2697–2704.

Koster, W. (2005) Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope. *Front Biosci-Landmark* **10**: 462–477.

Kümmerli, R., Jiricny, N., Clarke, L.S., West, S.A., and Griffin, A.S. (2009) Phenotypic plasticity of a cooperative behaviour in bacteria. *J Evol Biol* **22**: 589–598.

Laffont, C., Brutesco, C., Hajjar, C., Cullia, G., Fanelli, R., Ouerdane, L., et al. (2019) Simple rules govern the diversity of bacterial nicotianamine-like metallophores. *Biochem J* **476**: 2221–2233.

Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 7072–7077.

Lau, C.K.Y., Krewulak, K.D., and Vogel, H.J. (2016) Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev* **40**: 273–298.

Lee, J., Attila, C., Cirillo, S.L.G., Cirillo, J.D., and Wood, T.K. (2009) Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb Biotechnol* **2**: 75–90.

Lee, J. and Zhang, L. (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* **6**: 26–41.

Lee, J.-H., Wood, T.K., and Lee, J. (2015) Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule. *Trends Microbiol* **23**: 707–718.

Lewis, L.A., Sung, M.-H., Gipson, M., Hartman, K., and Dyer, D.W. (1998) Transport of Intact Porphyrin by HpuAB, the Hemoglobin-Haptoglobin Utilization System of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **180**: 6043–6047.

Lhospice, S., Gomez, N.O., Ouerdane, L., Brutesco, C., Ghseini, G., Hajjar, C., et al. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Sci Rep* **7**: 17132.

Li, N., Zhang, C., Li, B., Liu, X., Huang, Y., Xu, S., and Gu, L. (2012) Unique iron coordination in iron-chelating molecule vibriobactin helps *Vibrio cholerae* evade mammalian siderocalin-mediated immune response. *J Biol Chem* **287**: 8912–8919.

Lin, J., Cheng, J., Wang, Y., and Shen, X. (2018) The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Front Cell Infect Microbiol* **8**.

Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., et al. (2017) A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nat Commun* **8**: 14888.

Lindhout, T., Lau, P.C.Y., Brewer, D., and Lam, J.S. (2009) Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology* **155**: 3449–3460.

Little, A.S., Okkotsu, Y., Reinhart, A.A., Damron, F.H., Barbier, M., Barrett, B., et al. (2018) *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Phosphorylation Status Differentially Regulates Pyocyanin and Pyoverdine Production. *mBio* **9**: 10.1128/mbio.02318-17.



Llamas, M.A., Imperi, F., Visca, P., and Lamont, I.L. (2014) Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev* 38: 569–597.

Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Ratledge, C., and Bitter, W. (2008) Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol* 67: 458–472.

Llamas, M.A., Sparrius, M., Kloet, R., Jiménez, C.R., Vandenbroucke-Grauls, C., and Bitter, W. (2006) The Heterologous Siderophores Ferrioxamine B and Ferrichrome Activate Signaling Pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188: 1882–1891.

Loll, P.J., Grasty, K.C., Shultis, D.D., Guzman, N.J., and Wiener, M.C. (2024) Discovery and structural characterization of the D-box, a conserved TonB motif that couples an inner-membrane motor to outer-membrane transport. *J Biol Chem* 300:.

Loomis, L.D. and Raymond, K.N. (1991) Solution equilibria of enterobactin and metal-enterobactin complexes. *Inorg Chem* 30: 906–911.

Loper, J.E. and Henkels, M.D. (1999) Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 65: 5357–5363.

Lopez-Medina, E., Fan, D., Coughlin, L.A., Ho, E.X., Lamont, I.L., Reimann, C., et al. (2015) *Candida albicans* Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Suppression of Pyochelin and Pyoverdine Biosynthesis. *PLOS Pathog* 11: e1005129.

Luscher, A., Gasser, V., Bumann, D., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., and Köhler, T. (2022) Plant-Derived Catechols Are Substrates of TonB-Dependent Transporters and Sensitize *Pseudomonas aeruginosa* to Siderophore-Drug Conjugates. *mBio* 13: e0149822.

Luzar, M.A. and Montie, T.C. (1985) Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 50: 572–576.

Ma, X., Zeng, J., Xiao, W., Li, W., Cheng, J., and Lin, J. (2024) Relationship between Pyochelin and *Pseudomonas* Quinolone Signal in *Pseudomonas aeruginosa*: A Direction for Future Research. *Int J Mol Sci* 25: 8611.

Madigan, M.T., Madigan, M.T., and Brock, T.D. eds. (2009) Brock biology of microorganisms, 12th ed. San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings.

Madsen, J.L.H., Johnstone, T.C., and Nolan, E.M. (2015) Chemical Synthesis of Staphyloferrin B Affords Insight into the Molecular Structure, Iron Chelation, and Biological Activity of a

Polycarboxylate Siderophore Deployed by the Human Pathogen *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc* **137**: 9117–9127.

Malhotra, S., Hayes, D., and Wozniak, D.J. (2019) Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin Microbiol Rev* **32**: e00138-18.

Manko, H., Steffan, T., Gasser, V., Mély, Y., Schalk, I., and Godet, J. (2024) PvdL Orchestrates the Assembly of the Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in Pyoverdine Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* **25**: 6013.

Marshall, B., Stintzi, A., Gilmour, C., Meyer, J.-M., and Poole, K. (2008) Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology* **155**: 305–315.

Mashburn, L.M., Jett, A.M., Akins, D.R., and Whiteley, M. (2005) *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *J Bacteriol* **187**: 554–566.

Mastropasqua, M.C., D'Orazio, M., Cerasi, M., Pacello, F., Gismondi, A., Canini, A., et al. (2017) Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in zinc poor environments is promoted by a nicotianamine-related metallophore. *Mol Microbiol* **106**: 543–561.

McFarlane, J.S., Davis, C.L., and Lamb, A.L. (2018) Staphylopin, pseudopaline, and yersinopine dehydrogenases: A structural and kinetic analysis of a new functional class of opine dehydrogenase. *J Biol Chem* **293**: 8009–8019.

McMorran, B.J., Shantha Kumara, H.M.C., Sullivan, K., and Lamont, I.L. (2001) Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol U K* **147**: 1517–1524.

Meneely, K.M., Luo, Q., Riley, A.P., Taylor, B., Roy, A., Stein, R.L., et al. (2014) Expanding the results of a high throughput screen against an isochorismate-pyruvate lyase to enzymes of a similar scaffold or mechanism. *Bioorg Med Chem* **22**: 5961–5969.

Mevers, E., Saurí, J., Helfrich, E.J.N., Henke, M., Barns, K.J., Bugni, T.S., et al. (2019) Pyonitrins A–D: Chimeric Natural Products Produced by *Pseudomonas protegens*. *J Am Chem Soc* **141**: 17098–17101.

Meyer, J.M. (1992) Exogenous siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: possible involvement of porin OprF in iron translocation. *J Gen Microbiol* **138**: 951–958.

Meyer, J.M. and Abdallah, M.A. (1978) The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Microbiology* **107**: 319–328.

Meyer, J.-M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (1997) Use of Siderophores to Type Pseudomonads: The Three Pseudomonas Aeruginosa Pyoverdine Systems. *Microbiology* **143**: 35–43.

Mf, S., An, B., Mt, R., G, D., and T, B. (2022) PvdM of fluorescent pseudomonads is required for the oxidation of ferribactin by PvdP in periplasmic pyoverdine maturation. *J Biol Chem* **298**..

Michel, L., Bachelard, A., and Reimmann, C. (2007) Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiol Read Engl* **153**: 1508–1518.

Michel, L., González, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T., and Reimmann, 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.

Miethke, M. and Marahiel, M.A. (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **71**: 413–451.

Migula, W. (1900) System der bakterien. Handbuch der morphologie, entwicklungsgeschichte und systematik der bakterien, Jena: G. Fischer.

Mishra, M., Byrd, M.S., Sergeant, S., Azad, A.K., Parsek, M.R., McPhail, L., et al. (2012) Pseudomonas aeruginosa Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cell Microbiol* **14**: 95–106.

Mislin, G.L.A. and 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.

Molina-Henares, A.J., Krell, T., Eugenia Guazzaroni, M., Segura, A., and 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.

Moreau-Marquis, S., Stanton, B.A., and O'Toole, G.A. (2008) Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther* **21**: 595–599.

Mouriño, S., Giardina, B.J., Reyes-Caballero, H., and Wilks, A. (2016) Metabolite-driven Regulation of Heme Uptake by the Biliverdin IX $\beta$ / $\delta$ -Selective Heme Oxygenase (HemO) of Pseudomonas aeruginosa\*. *J Biol Chem* **291**: 20503–20515.

Moynié, L., Luscher, A., Rolo, D., Pletzer, D., Tortajada, A., Weingart, H., et al. (2017) Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **61**: e02531-16.

Moynié, L., Milenkovic, S., Mislin, G.L.A., Gasser, V., Mallocci, G., Baco, E., et al. (2019) The complex of ferric-enterobactin with its transporter from *Pseudomonas aeruginosa* suggests a two-site model. *Nat Commun* **10**: 3673.

Mridha, S., Wechsler, T., and Kümmerli, R. (2024) Space and genealogy determine inter-individual differences in siderophore gene expression in bacterial colonies. *Cell Rep* **43**: 114106.

Mular, A., Shanzer, A., Kozłowski, H., Hubmann, I., Misslinger, M., Krzywik, J., et al. (2021) Cyclic Analogs of Desferrioxamine E Siderophore for <sup>68</sup>Ga Nuclear Imaging: Coordination Chemistry and Biological Activity in *Staphylococcus aureus*. *Inorg Chem* **60**: 17846–17857.

Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., and Lewenza, S. (2008) Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLOS Pathog* **4**: e1000213.

Müller, S.I., Valdebenito, M., and Hantke, K. (2009) Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. *BioMetals* **22**: 691–695.

Mullis, K.B., Pollack, J.R., and Neilands, J.B. (1971) Structure of schizokinen, An iron-transport compound from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* **10**: 4894–4898.

Musk, D.J., Banko, D.A., and Hergenrother, P.J. (2005) Iron Salts Perturb Biofilm Formation and Disrupt Existing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Biol* **12**: 789–796.

Nagano, Y., Millar, B.C., Johnson, E., Goldsmith, C.E., Elborn, J.S., Rendall, J., and Moore, J.E. (2007) Fungal infections in patients with cystic fibrosis. *Rev Res Med Microbiol* **18**: 11.

Neilands, J.B. (1952) A Crystalline Organo-iron Pigment from a Rust Fungus (*Ustilago sphaerogena*). *J Am Chem Soc* **74**: 4846–4847.

Neilands, J.B. (1973) Chemistry of Iron in Biological Systems. In *Metal Ions in Biological Systems: Studies of Some Biochemical and Environmental Problems*. Dhar, S.K. (ed). Boston, MA: Springer US, pp. 13–42.

Neilands, J.B. (1981) Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* **50**: 715–731.

Neubauer, U., Nowack, B., Furrer, G., and Schulin, R. (2000) Heavy Metal Sorption on Clay Minerals Affected by the Siderophore Desferrioxamine B. *Environ Sci Technol* **34**: 2749–2755.

Neugebauer, H., Herrmann, C., Kammer, W., Schwarz, G., Nordheim, A., and 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.

Nguyen, A.T., O'Neill, M.J., Watts, A.M., Robson, C.L., Lamont, I.L., Wilks, A., and Oglesby-Sherrouse, A.G. (2014) Adaptation of Iron Homeostasis Pathways by a *Pseudomonas aeruginosa* Pyoverdine Mutant in the Cystic Fibrosis Lung. *J Bacteriol* **196**: 2265–2276.

Niehus, R., Picot, A., Oliveira, N.M., Mitri, S., and Foster, K.R. (2017) The evolution of siderophore production as a competitive trait. *Evol Int J Org Evol* **71**: 1443–1455.

Nikaido, H., Kim, S.-H., and Rosenberg, E.Y. (1993) Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Mol Microbiol* **8**: 1025–1030.

Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., and Buchanan, S.K. (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* **64**: 43–60.

Normant, V., Josts, I., Kuhn, L., Perraud, Q., Fritsch, S., Hammann, P., et al. (2020) Nocardamine-Dependent Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Exclusive Involvement of the FoxA Outer Membrane Transporter. *ACS Chem Biol* **15**: 2741–2751.

Normant, V., Kuhn, L., Munier, M., Hammann, P., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2021) How the Presence of Hemin Affects the Expression of the Different Iron Uptake Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* Cells. *ACS Infect Dis*.

Norrestam, R., Stensland, B., and Brändén, C.I. (1975) On the conformation of cyclic iron-containing hexapeptides: the crystal and molecular structure of ferrichrysin. *J Mol Biol* **99**: 501–506.

Ó Cuív, P., Clarke, P., Lynch, D., and O'Connell, M. (2004) Identification of *rhtX* and *fptX*, Novel Genes Encoding Proteins That Show Homology and Function in the Utilization of the Siderophores Rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and Pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, Respectively. *J Bacteriol* **186**: 2996–3005.

O'Brien, I.G. and Gibson, F. (1970) The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-*N*-benzoyle conjugates from *Escherichia Coli*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* **215**: 393–402.

Ochsner, U.A., Johnson, Z., and Vasil, M.L. (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl* **146** ( Pt 1): 185–198.

Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* **45**: 1277–1287.

Ogierman, M. and Braun, V. (2003) Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: studies of the FecA TonB box. *J Bacteriol* **185**: 1870–1885.

Oglesby, A.G., Farrow, J.M., Lee, J.-H., Tomaras, A.P., Greenberg, E.P., Pesci, E.C., and Vasil, M.L. (2008) The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. *J Biol Chem* **283**: 15558–15567.

Oglesby-Sherrouse, A.G. and Vasil, M.L. (2010) Characterization of a Heme-Regulated Non-Coding RNA Encoded by the prrF Locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE* **5**: e9930.

Oliveira, M., Cunha, E., Tavares, L., and Serrano, I. (2023) *P. aeruginosa* interactions with other microbes in biofilms during co-infection. *AIMS Microbiol* **9**: 612–646.

Otero-Asman, J.R., García-García, A.I., Civantos, C., Quesada, J.M., and Llamas, M.A. (2019) *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem. *Environ Microbiol* **21**: 4629–4647.

O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000) Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49–79.

O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295–304.

Palma, M., Worgall, S., and Quadri, L.E.N. (2003) Transcriptome analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* response to iron. *Arch Microbiol* **180**: 374–379.

Papenfort, K. and Melamed, S. (2023) Small RNAs, Large Networks: Posttranscriptional Regulons in Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Microbiol*.

Pederick, V.G., Eijkelkamp, B.A., Begg, S.L., Ween, M.P., McAllister, L.J., Paton, J.C., and McDevitt, C.A. (2015) ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* **5**: 13139.

Peek, M.E., Bhatnagar, A., McCarty, N.A., and Zughaier, S.M. (2012) Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, Evades NGAL Recognition. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2012**: 843509.

Peng, J., Chen, G., Xu, X., Wang, T., and Liang, H. (2020) Iron facilitates the RetS-Gac-Rsm cascade to inversely regulate protease IV (piv) expression via the sigma factor PvdS in. *Environ Microbiol* **22**: 5402–5413.

Pérard, J., Covès, J., Castellan, M., Solard, C., Savard, M., Miras, R., et al. (2016) Quaternary Structure of Fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. *Biochemistry* **55**: 1503–1515.

Perraud, Q., Cantero, P., Roche, B., Gasser, V., Normant, V.P., Kuhn, L., et al. (2020) Phenotypic Adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Mol Cell Proteomics MCP* **19**: 589–607.

Perraud, Q., Kuhn, L., Fritsch, S., Graulier, G., Gasser, V., Normant, V., et al. (2020) Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*.

Perraud, Q., Moynié, L., Gasser, V., Munier, M., Godet, J., Hoegy, F., et al. (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.

Perry, R.D., Balbo, P.B., Jones, H.A., Fetherston, J.D., and DeMoll, E. (1999) Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiol Read Engl* **145 ( Pt 5)**: 1181–1190.

Perry, R.D., Bobrov, A.G., and Fetherston, J.D. (2015) The role of transition metal transporters for iron, zinc, manganese, and copper in the pathogenesis of *Yersinia pestis*. *Metallomics* **7**: 965–978.

Perry, R.D. and San Clemente, C.L. (1979) Siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae* and *Shigella sonnei* during iron deficiency. *J Bacteriol* **140**: 1129–1132.

Persmark, M., Pittman, P., Buyer, J.S., Schwyn, B., Jr, P.R.G., and Neilands, J.B. (2002) Isolation and structure of rhizobactin 1021, a siderophore from the alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. *ACS Publ*.

Peukert, C., Gasser, V., Orth, T., Fritsch, S., Normant, V., Cunrath, O., et al. (2022) Trojan Horse Siderophore Conjugates Induce *Pseudomonas aeruginosa* Suicide and Qualify the TonB Protein as a Novel Antibiotic Target. *J Med Chem*.

Pletzer, D., Braun, Y., and 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.



Pogoutse, A.K. and Moraes, T.F. (2017) Iron acquisition through the bacterial transferrin receptor. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **52**: 314–326.

Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M.L. (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**: 903–915.

Pollack, J.R. and Neilands, J.B. (1970) Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun* **38**: 989–992.

Poole, K., Neshat, S., and Heinrichs, D. (1991) Pyoverdine-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *FEMS Microbiol Lett* **78**: 1–5.

Poole, K., Young, L., and Neshat, S. (1990) Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**: 6991–6996.

Pottier, M., Gravey, F., Castagnet, S., Auzou, M., Langlois, B., Guérin, F., et al. (2023) A 10-year microbiological study of *Pseudomonas aeruginosa* strains revealed the circulation of populations resistant to both carbapenems and quaternary ammonium compounds. *Sci Rep* **13**: 2639.

Potvin, E., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 38–55.

Rabsch, W., Ma, L., Wiley, G., Najar, F.Z., Kaserer, W., Schuerch, D.W., et al. (2007) FepA- and TonB-Dependent Bacteriophage H8: Receptor Binding and Genomic Sequence. *J Bacteriol* **189**: 5658–5674.

Rai, V., Fisher, N., Duckworth, O.W., and Baars, O. (2020) Extraction and Detection of Structurally Diverse Siderophores in Soil. *Front Microbiol* **11**: 581508.

Rampioni, G., Falcone, M., Heeb, S., Frangipani, E., Fletcher, M.P., Dubern, J.-F., et al. (2016) Unravelling the Genome-Wide Contributions of Specific 2-Alkyl-4-Quinolones and PqsE to Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathog* **12**: e1006029.

Ratlidge, C. and Ewing, M. (1996) The occurrence of carboxymycobactin, the siderophore of pathogenic mycobacteria, as a second extracellular siderophore in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiol Read Engl* **142 ( Pt 8)**: 2207–2212.

Ratliff, A.C., Buchanan, S.K., and Celia, H. (2022) The Ton Motor. *Front Microbiol* **13**:

Reimmann, C., Patel, H.M., Walsh, C.T., and Haas, D. (2004) PchC Thioesterase Optimizes Nonribosomal Biosynthesis of the Peptide Siderophore Pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**: 6367–6373.

Reimmann, C., Serino, L., Beyeler, M., and Haa, D. (1998) Dihydroaeruginic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **144**: 3135–3148.

Rieu, M., Krutyholowa, R., Taylor, N.M.I., and Berry, R.M. (2022) A new class of biological ion-driven rotary molecular motors with 5:2 symmetry. *Front Microbiol* **13**:

Ringel, M.T. and Brüser, T. (2018) The biosynthesis of pyoverdines. *Microb Cell* **5**: 424–437.

Rivera, M. (2017) Bacterioferritin: Structure, Dynamics, and Protein–Protein Interactions at Play in Iron Storage and Mobilization. *Acc Chem Res* **50**: 331–340.

Roche, B., Garcia-Rivera, M.A., Normant, V., Kuhn, L., Hammann, P., Brönstrup, M., et al. (2021) A role for PchHI as the ABC transporter in iron acquisition by the siderophore pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*.

Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., and Foglino, M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**: 498–504.

le Roy, D., Expert, D., Razafindratsita, A., Deroussent, A., Cosme, J., Bohuon, C., and Andremont, A. (1992) Activity and specificity of a mouse monoclonal antibody to ferric aerobactin. *Infect Immun* **60**: 768–772.

Runyen-Janecky, L.J., Reeves, S.A., Gonzales, E.G., and Payne, S.M. (2003) Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun* **71**: 1919–1928.

Rutherford, S.T. and Bassler, B.L. (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a012427.

Sánchez, M., Sabio, L., Gálvez, N., Capdevila, M., and Dominguez-Vera, J.M. (2017) Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life* **69**: 382–388.

Sánchez-Hevia, D.L., Yuste, L., Moreno, R., and 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.

Sánchez-Jiménez, A., Llamas, M.A., and Marcos-Torres, F.J. (2023) Transcriptional Regulators Controlling Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* **24**: 11895.

Sánchez-Jiménez, A., Marcos-Torres, F.J., and Llamas, M.A. (2023) Mechanisms of iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* and emerging therapeutics directed to disrupt this vital process. *Microb Biotechnol*.

Santé Publique France (2022) Principaux résultats de l'enquête nationale de prévalence 2022 des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé. 2023 88.

Sass, G., Ansari, S.R., Dietl, A.-M., Déziel, E., Haas, H., and Stevens, D.A. (2019) Intermicrobial interaction: *Aspergillus fumigatus* siderophores protect against competition by *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One* **14**: e0216085.

Sass, G., Nazik, H., Penner, J., Shah, H., Ansari, S.R., Clemons, K.V., et al. (2017) Studies of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Indicate Pyoverdine as the Central Factor in Inhibition of *Aspergillus fumigatus* Biofilm. *J Bacteriol* **200**: 10.1128/jb.00345-17.

Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., and Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140–1154.

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P.S., and Bjarnsholt, T. (2022) The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol* **20**: 608–620.

Sauvage, S., Gaviard, C., Tahrioui, A., Coquet, L., Le, H., Alexandre, S., et al. (2022) Impact of Carbon Source Supplementations on *Pseudomonas aeruginosa* Physiology. *J Proteome Res* **21**: 1392–1407.

Schalk, I.J., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2002) A new mechanism for membrane iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Soc Trans* **30**: 702–705.

Schalk, I.J. and Guillon, L. (2013) Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environ Microbiol* **15**: 1661–1673.

Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., and Brillet, K. (2012) Chapter Two - Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore–Iron Outer Membrane Transporters. In *Current Topics in Membranes*. Metal Transporters. Argüello, J.M. and Lutsenko, S. (eds). Academic Press, pp. 37–66.

Schalk, I.J. and Perraud, Q. (2022) *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environ Microbiol*.

Schalk, I.J., Rigouin, C., and Godet, J. (2020) An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. *Environ Microbiol* **22**: 1447–1466.

Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., et al. (2007) Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog* **3**: 1195–1207.

Schroeter, D.J. (1872) Ueber einige diircli Bacterien gebildete Pigmente. **1**: 109–126.

Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., et al. (2015) Elucidation of Sigma Factor-Associated Networks in *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Modular Architecture with Limited and Function-Specific Crosstalk. *PLOS Pathog* **11**: e1004744.

Schwarzenbach, G. and Schwarzenbach, K. (1963) Hydroxamatkomplexe I. Die Stabilität der Eisen(III)-Komplexe einfacher Hydroxamsäuren und des Ferrioxamins B. *Helv Chim Acta* **46**: 1390–1400.

Secli, V., Michetti, E., Pacello, F., Iacovelli, F., Falconi, M., Astolfi, M.L., et al. (2024) Investigation of Zur-regulated metal transport systems reveals an unexpected role of pyochelin in zinc homeostasis. *mBio* e0239524.

Serino, L., Reimmann, C., Visca, P., Beyeler, M., Chiesa, V.D., and Haas, D. (1997) Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron-regulated pchDCBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 248–257.

Shi, Q., Zeng, S., Yu, R., Li, M., Shen, C., Zhang, X., et al. (2024) The small RNA PrrH aggravates *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury by regulating the type III secretion system activator ExsA. *Microbiol Spectr* e0062623.

Shrout, J.D., Chopp, D.L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M., and Parsek, M.R. (2006) The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **62**: 1264–1277.

Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., and Jackson, R.W. (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 652–680.

Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., and Welsh, M.J. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* **417**: 552–555.

Smith, A.D. and 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.

Spiro, S. and Guest, J.R. (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 399–428.

Steingard, C.H. and Helmann, J.D. (2023) Meddling with Metal Sensors: Fur-Family Proteins as Signaling Hubs. *J Bacteriol* e0002223.

Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183–215.

Stojiljkovic, I. and Hantke, K. (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J* **11**: 4359–4367.

Stojiljkovic, I. and Perkins-Balding, D. (2002) Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA Cell Biol* **21**: 281–295.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187–209.

Storey, E.P., Boghazian, R., Little, J.L., Lowman, D.W., and Chakraborty, R. (2006) Characterization of “Schizokinen”; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **19**: 637–649.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959–964.

Strateva, T. and Mitov, I. (2011) Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol* **61**: 717–732.

Thulasiraman, P., Newton, S.M.C., Xu, J., Raymond, K.N., Mai, C., Hall, A., et al. (1998) Selectivity of Ferric Enterobactin Binding and Cooperativity of Transport in Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol* **180**: 6689–6696.

Tong, Y. and Guo, M. (2009) Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch Biochem Biophys* **481**: 1–15.

Troxell, B., Xu, H., and Yang, F. (2012) *Borrelia burgdorferi*, a pathogen that lacks iron, encodes manganese-dependent superoxide dismutase essential for resistance to streptonigrin. *J Biol Chem* **287**:

Tseng, C.-F., Burger, A., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., Yu, S.S.-F., Chan, S.I., and Abdallah, M.A. (2006) Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *JBIC J Biol Inorg Chem* **11**: 419–432.

Ulrich, L.E., Koonin, E.V., and Zhulin, I.B. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* **13**: 52–56.

Upritchard, H.G., Yang, J., Bremer, P.J., Lamont, I.L., and McQuillan, A.J. (2007) Adsorption to metal oxides of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyoverdine and implications for bacterial biofilm formation on metals. *Langmuir ACS J Surf Colloids* **23**: 7189–7195.

Uzi-Gavrilov, S., Tik, Z., Sabti, O., and Meijler, M.M. (2023) Chemical Modification of a Bacterial Siderophore by a Competitor in Dual-Species Biofilms. *Angew Chem Int Ed* **62**: e202300585.

Valentini, M. and Filloux, A. (2016) Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J Biol Chem* **291**: 12547–12555.

Varma, A. and Chincholkar, S.B. eds. (2007) *Microbial Siderophores*, Berlin, Heidelberg: Springer.

Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., et al. (2006) Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 171–176.

Verbrugghe, E., Boyen, F., Gaastra, W., Bekhuis, L., Leyman, B., Van Parys, A., et al. (2012) The complex interplay between stress and bacterial infections in animals. *Vet Microbiol* **155**: 115–127.

Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Boussac, A., Marty, L., Lo Bello, L., Legrand, P., et al. (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.

Wagner, E.G.H. and 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.

Wang, Y., Wilks, J.C., Danhorn, T., Ramos, I., Crael, L., and Newman, D.K. (2011) Phenazine-1-Carboxylic Acid Promotes Bacterial Biofilm Development via Ferrous Iron Acquisition. *J Bacteriol* **193**: 3606–3617.

Weaver, V.B. and Kolter, R. (2004) Burkholderia spp. alter Pseudomonas aeruginosa physiology through iron sequestration. *J Bacteriol* **186**: 2376–2384.

Wettstadt, S., Marcos-Torres, F.J., Otero-Asman, J.R., García-Puente, A., Ortega, Á., and Llamas, M.A. (2024) Bacterial TonB-dependent transducers interact with the anti- $\sigma$  factor in absence of the inducing signal protecting it from proteolysis. *PLoS Biol* **22**: e3002920.

Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., and Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.

Widder, S., Allen, R.J., Pfeiffer, T., Curtis, T.P., Wiuf, C., Sloan, W.T., et al. (2016) Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *ISME J* **10**: 2557–2568.

Wilderman, P.J., Sowa, N.A., FitzGerald, D.J., FitzGerald, P.C., Gottesman, S., Ochsner, U.A., and Vasil, M.L. (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in Pseudomonas aeruginosa involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 9792–9797.

Wilks, A. (2002) Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxid Redox Signal* **4**: 603–614.

Will, V., Frey, C., Normant, V., Kuhn, L., Chicher, J., Volck, F., and Schalk, I.J. (2024) The role of FoxA, FiuA, and FpvB in iron acquisition via hydroxamate-type siderophores in Pseudomonas aeruginosa. *Sci Rep* **14**: 18795.

Will, V., Gasser, V., Kuhn, L., Fritsch, S., Heinrichs, D.E., and Schalk, I.J. (2023) Siderophore specificities of the Pseudomonas aeruginosa TonB-dependent transporters ChtA and ActA. *FEBS Lett* **597**: 2963–2974.

Will, V., Moynié, L., Si Ahmed Charrier, E., Le Bas, A., Kuhn, L., Volck, F., et al. (2025) Structure of the Outer Membrane Transporter FemA and Its Role in the Uptake of Ferric Dihydro-Aeruginic Acid and Ferric Aeruginic Acid in Pseudomonas aeruginosa. *ACS Chem Biol*.

Wilson, B.R., Bogdan, A.R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., and Tsuji, Y. (2016) Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends Mol Med* **22**: 1077–1090.

Wilson, T., Mouriño, S., and Wilks, A. (2021) The heme-binding protein PhuS transcriptionally regulates the Pseudomonas aeruginosa tandem sRNA prrF1,F2 locus. *J Biol Chem* **296**..

Winterbourn, C.C. (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* **82–83**: 969–974.

Wirth, C., Meyer-Klaucke, W., Pattus, F., and Cobessi, D. (2007) From the Periplasmic Signaling Domain to the Extracellular Face of an Outer Membrane Signal Transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: Crystal Structure of the Ferric Pyoverdine Outer Membrane Receptor. *J Mol Biol* **368**: 398–406.

Wolz, C., Hohloch, K., Ocaktan, A., Poole, K., Evans, R.W., Rochel, N., et al. (1994) Iron release from transferrin by pyoverdin and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **62**: 4021–4027.

Wong, G.B., Kappel, M.J., Raymond, K.N., Matzanke, B., and Winkelmann, G. (1983) Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 24. Characterization of coprogen and ferricrocin, two ferric hydroxamate siderophores. *J Am Chem Soc* **105**: 810–815.

World Health Organization (2024) WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance, 1st ed. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization (2017) World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, Geneva: World Health Organization.

Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., et al. (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* **109**: 317–325.

Yang, J., Tauschek, M., and Robins-Browne, R.M. (2011) Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Trends Microbiol* **19**: 128–135.

Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. (2007) Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl* **153**: 1318–1328.

Ye, L., Cornelis, P., Guillemyn, K., Ballet, S., Christophersen, C., and Hammerich, O. (2014) Structure Revision of N-Mercapto-4-formylcarbostyryl Produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-Hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. *Nat Prod Commun* **9**: 1934578X1400900615.

Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2010) Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* **38**: 1447–1459.



Yoneyama, H. and 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.

Yu, S., Wei, Q., Zhao, T., Guo, Y., and Ma, L.Z. (2016) A Survival Strategy for *Pseudomonas aeruginosa* That Uses Exopolysaccharides To Sequester and Store Iron To Stimulate Psl-Dependent Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* **82**: 6403–6413.

Yukl, E.T., Jepkorir, G., Alontaga, A.Y., Pautsch, L., Rodriguez, J.C., Rivera, M., and Moënne-Loccoz, P. (2010) Kinetic and Spectroscopic Studies of Hemin Acquisition in the Hemophore HasAp from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **49**: 6646–6654.

Zamri, A. and Abdallah, M.A. (2000) An improved stereocontrolled synthesis of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Tetrahedron* **56**: 249–256.

Zhan, X., Zhang, K., Wang, C., Fan, Q., Tang, X., Zhang, X., et al. (2024) A c-di-GMP signaling module controls responses to iron in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* **15**: 1860.

Zhang, H., Yang, J., Cheng, J., Zeng, J., Ma, X., and Lin, J. (2024) PQS and pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa* share inner membrane transporters to mediate iron uptake. *Microbiol Spectr* e0325623.

Zinke, M., Lejeune, M., Mechaly, A., Bardiaux, B., Boneca, I.G., Delepelaire, P., and Izadi-Pruneyre, N. (2024) Ton motor conformational switch and peptidoglycan role in bacterial nutrient uptake. *Nat Commun* **15**: 331.





# Acquisition du fer par les xénosidérophores chez *Pseudomonas aeruginosa* : adaptation à l'environnement bactérien

## Résumé

Le fer, essentiel à la croissance microbienne, est peu biodisponible dans la plupart des environnements. Pour l'acquérir, les bactéries produisent et sécrètent des sidérophores, de petites molécules ayant une très forte affinité pour le fer. *Pseudomonas aeruginosa* en produit deux, mais peut aussi utiliser des sidérophores produits par d'autres bactéries (xénosidérophores), grâce à 15 voies d'acquisition du fer codées dans son génome. L'import des complexes fer-sidérophores dans le périplasma repose sur des transporteurs TonB-dépendants (TBDTs). Cette thèse a exploré l'utilisation de xénosidérophores et de chélateurs synthétiques en culture planctonique, identifiant 19 nouveaux xénosidérophores utilisés par *P. aeruginosa* et les TBDTs associés. Elle a également mis en évidence des spécificités de liaison et de transport de certains TBDTs. Des études en biofilm ont révélé, pour la première fois, une utilisation préférentielle des xénosidérophores aux stades précoces de développement.

**Mots clés :** Sidérophore, homéostasie du fer, *Pseudomonas aeruginosa*, transporteur TonB-dépendant, biofilm.

## Abstract

Iron is an essential nutrient for microbial growth but is poorly bioavailable in most environments. To acquire it, bacteria produce and secrete siderophores – small molecules with a very high affinity for iron. *Pseudomonas aeruginosa* produces two siderophores but can also use siderophores produced by other bacteria (xenosiderophores), thanks to 15 iron acquisition pathways encoded in its genome. The import of iron-siderophore complexes into the periplasm relies on TonB-dependent transporters (TBDTs). This thesis explored the use of xenosiderophores and synthetic chelators in planktonic culture, identifying 19 new xenosiderophores used by *P. aeruginosa* and their associated TBDTs. It also revealed specific binding and transport features for some TBDTs. Biofilm studies showed, for the first time, a preferential use of xenosiderophores during early stages of development.

**Keywords:** Siderophore, iron homeostasis, *Pseudomonas aeruginosa*, TonB-dependent transporter, biofilm.